



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

“Trabajo de grado previo a la obtención del Título de Ingeniero  
Agroindustrial”

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

Título del proyecto:

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CARBOXIMETIL  
CELULOSA (CMC) A PARTIR DE LOS FORRAJES PASTO  
ELEFANTE (*Pennisetum sp*) Y KING GRASS (*Pennisetum hybridum*)  
PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.**

Autor : Carmen Antonieta Cazco Barba

Director: Dra. Ana Mejía López

Riobamba – Ecuador

AÑO

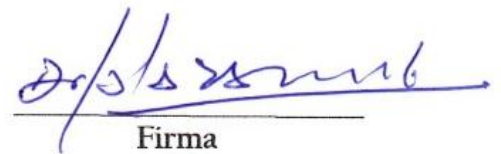
2017

Los miembros del Tribunal de Graduación del proyecto de investigación de título: **OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA (CMC) A PARTIR DE LOS FORRAJES PASTO ELEFANTE (*Pennisetum sp*) Y KING GRASS (*Pennisetum hybridum*) PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.** Presentado por Carmen Antonieta Cazco Barba y dirigida por: Dra. Ana Mejía.

Una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en la cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la UNACH.

Para constancia de lo expuesto firman:

Dr. Mario Salazar  
Presidente del Tribunal



Firma

Dra. Ana Mejía López  
Director del Proyecto



Firma

Ing. Cristina Almeida  
Miembro del Tribunal



Firma

## **AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, nos corresponde exclusivamente a: **CARMEN ANTONIETA CAZCO BARBA** y de la Directora del Proyecto: Dra. Ana Mejía López y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.



**Carmen Antonieta Cazco Barba**  
**C.I. 060386443-0**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a las personas y organismos que me han ayudado y han contribuido a la realización de este proyecto.

A mis Padres y a mis hermanas por ser impulsores de este proyecto y soporte económico, sin el cual esta investigación no hubiera sido posible.

A mis amigos, compañeros por las vivencias y recuerdos en todos estos años de estudio.

A la Universidad Nacional de Chimborazo por los conocimientos y a su personal docente por su guía oportuna para desarrollar este proyecto.



## **DEDICATORIA**

Esta Tesis se la dedico a Dios y a la Virgen María Auxiliadora por su guía y protección en el transcurso de estos años de estudio. A mi hermana Ing. María Elisa Cazco Barba quien colaboró inicialmente en el planteamiento del tema y su apoyo en el transcurso de este estudio. A mis Padres por ser mi soporte para continuar a dar el último paso a mi titulación. A mi hermana Cristina quien con su sabiduría me brindaba ánimos y a mis sobrinos Raúl y María del Carmen quienes fueron mi motivación para continuar con este proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	ix
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
1.FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	4
1.1.ANTECEDENTES .....	4
1.2.ENFOQUE TEÓRICO .....	6
1.2.1.PASTO ELEFANTE .....	6
1.2.2.KING GRASS .....	7
1.2.3CARACTERIZACIÓN DE FORRAJES.....	8
1.2.4.FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS.....	9
1.2.5.COMPOSICIÓN QUÍMICA- FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS .....	10
1.2.6.PRODUCTOS DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	10
1.2.6.2.AISLAMIENTO DE CELULOSA.....	11
1.2.6.3.USOS Y APLICACIONES DE CELULOSA .....	12
1.2.6.4.CARBOXIMETIL CELULOSA .....	13
1.2.6.5OBTENCIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA.....	13
1.2.6.6.APLICACIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA.....	14
1.2.6.7MÉTODO SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR).....	15
CAPÍTULO II.....	16
2.METODOLOGÍA.....	16
2.1.TIPO DE ESTUDIO .....	16
2.2.POBLACIÓN Y MUESTRA .....	17
2.3.OPERACIONALIAZCIÓN DE VARIABLES .....	18
2.4.PROCEDIMIENTOS .....	19
2.4.1.DESCRIPCIÓN DE EQUIPOS Y REACTIVOS .....	19
2.4.1.1.REACTIVOS .....	19

2.4.1.2.EQUIPOS E INSTRUMENTOS .....	20
2.5.PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS.....	20
2.5.1.1.Preparación de la Muestra .....	20
2.5.1.2.CARACTERIZACIÓN DE LOS FORRAJES .....	20
2.5.1.3.Determinación de Materia Seca (MS) .....	20
2.5.1.4.Determinación de Cenizas .....	20
2.5.1.5.Determinación de Fibra Detergente Neutro y Ácido.....	20
2.5.1.6.Determinación de Lignina y Celulosa .....	21
2.5.2.OBTENCIÓN DE CELULOSA .....	21
2.5.3.OBTENCIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA.....	21
2.5.4.CARACTERIZACIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA .....	24
2.5.4.2.GRADO DE PUREZA .....	25
2.5.4.3.VISCOSIDAD .....	26
2.5.5.MÉTODO SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR).....	26
CAPÍTULO III.....	27
3.RESULTADOS .....	27
CAPÍTULO IV .....	36
4.DISCUSIÓN .....	36
4.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE FORRAJES .....	36
CAPÍTULO V.....	44
5.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	44
5.1.CONCLUSIONES .....	44
5.2.RECOMENDACIONES .....	45
CAPÍTULO VI .....	46
6.PROUESTA .....	46
6.1.TÍTULO DE LA PROPUESTA .....	46
6.2.INTRODUCCIÓN .....	46
6.3.OBJETIVOS .....	47
6.3.1.GENERAL.....	47
6.4.FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO – TÉCNICA .....	47
6.5.DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA .....	49
6.6.METODOLOGÍA.....	49
6.6.1.OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE.....	50

6.6.2.PROCEDIMIENTOS .....	51
6.7.CRONOGRAMA .....	51
CAPÍTULO VII.....	52
7.BIBLIOGRAFÍA .....	52
CAPÍTULO VIII.....	56
8.APÉNDICE Y ANEXOS .....	56
Anexo 1 :Fotografías del Estudio .....	56
Anexo 2: Análisis de Varianza. ....	63
ANÁLISIS DE VARIANZA DE CELULOSA.....	63
ANÁLISIS DE VARIANZA EN CARBOXIMETIL CELULOSA .....	64
Anexo 3 : Costos de Producción .....	65
Anexos 4. Normas .....	66

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de Pasto Elefante .....	6
Tabla 2. Taxonomía de King Grass .....	8
Tabla 3. Carbohidratos presentes en los Forrajes .....	8
Tabla 4. Composición química de los Forrajes .....	9
Tabla 5. Técnicas del Estudio.....	19
Tabla 6. Reactivos Utilizados .....	19
Tabla 7. Equipos e Instrumentos utilizados.....	20
Tabla 8. Caracterización de KG Morado, KG Verde y Pasto Elefante. ....	27
Tabla 9. Datos Preliminares Experimentales NaOH-EDTA. ....	28
Tabla 10. Rendimiento de KG Verde, KG Morado y Pasto Elefante.....	32
Tabla 11. Datos Preliminares experimentales en NaOH (%)-MCA (g). ....	33
Tabla 12. Óptimas Condiciones y Resultados de Celulosa. ....	39
Tabla 13.Condiciones y Resultados Óptimos para CMC. ....	42
Tabla 14. Calidad de CMC en los Forrajes. ....	43
Tabla 15. Datos de Viscosidad de CMC.....	43
Tabla 16.Análisis de Varianza para el % Rendimiento. ....	63
Tabla 17.Análisis de Varianza para el % de Alfa-celulosa. ....	63
Tabla 18. Análisis de Varianza - % Cenizas.....	63

Tabla 19. ANOVA - Rendimiento CMC.....	64
Tabla 20. Análisis de Varianza para Grado de Sustitución. ....	64
Tabla 21. Análisis de Varianza para Grado de Pureza .....	64
Tabla 22. Costo de Producción de Celulosa .....	65
Tabla 23. Costos de Producción de Carboximetil Celulosa .....	65

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Estructura de Celulosa.....	11
Gráfico 2. Esquema de Aislamiento de Celulosa. ....	23
Gráfico 3. Esquema de Obtención de Carboximetil Celulosa. ....	24
Gráfico 4. Rendimiento Celulosa .....	30
Gráfico 5. Contenido de Alfa-celulosa. ....	30
Gráfico 6. MSR - Cantidad de Cenizas en Celulosa.....	31
Gráfico 7. MSR - Rendimiento de CMC.....	34
Gráfico 8. MSR- Grado de Sustitución.....	35
Gráfico 9. MSR- Grado de Pureza.....	35
Gráfico 10. Rendimiento de CMC por Dispersión. ....	40
Gráfico 11. Gráfico de Sustitución (GS) - Dispersión.....	41

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Formación de Álcali Celulosa.....	14
Ecuación 2. Formación de Carboximetil Celulosa. ....	14
Ecuación 3. Formación de Subproductos. ....	14
Ecuación 4. Modelo lineal ajustado de segundo orden de dos factores.....	15
Ecuación 5. Rendimiento de Celulosa .....	21
Ecuación 6. Rendimiento de Carboximetil celulosa.....	22
Ecuación 7. Grado de Sustitución.....	25
Ecuación 8. Grado de Pureza.....	25
Ecuación 9. Rendimiento de Celulosa obtenido. ....	29
Ecuación 10. Alfa - Celulosa obtenida. ....	29
Ecuación 11. Contenido de Cenizas obtenido. ....	29

Ecuación 12. Rendimiento de Carboximetil Celulosa obtenido.....	33
Ecuación 13. Grado de Sustitución de CMC.....	34
Ecuación 14. Grado de Pureza de CMC.....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis Fibra Detergente Neutro (FDN); Fibra Detergente Ácido (FDA).....	56
Figura 2. Filtrado luego del Reflujo .....	56
Figura 3. Secado de Muestras .....	56
Figura 4. Pesado de Muestras .....	57
Figura 5. Método de Permanganato para obtención de Lignina.....	57
Figura 6. Método de Permanganato - Blanqueamiento .....	57
Figura 7. Reflujo en Tallos .....	58
Figura 8. Reflujo en Hojas.....	58
Figura 9. Lavado y Blanqueamiento de Celulosa.....	58
Figura 10. Pesado de Celulosa.....	59
Figura 11. Celulosa a partir de forrajes.....	59
Figura 12. Reflujo en Carboximetil Celulosa.....	60
Figura 13. Suspensiones en Metanol .....	60
Figura 14. Carboximetil Celulosa a partir de forraje.....	61
Figura 15. Viscosidad medida en Jugo de Naranja.....	61
Figura 16. Viscosidad medida en Jugo con CMC .....	61
Figura 17. Tipos de Viscosidad de Carboximetil Celulosa .....	62

## Abreviaturas

°C	Grados Centígrados
R.P.M	Revoluciones por minuto
AGU	Anhidroglucopiraminosa
CMC	Carboximetil Celulosa
EDTA	Etilendiaminotetra acético
NaOH	Hidróxido de Sodio
pH	Potencial de Hidrógeno
$\alpha$	Alfa
$\mu\text{m}$	Micrómetro
g	Gramos
mPas	Mega pascales
%	Porcentaje
min	minutos
h	Hora

## RESUMEN

Los forrajes tienen celulosa en su estructura con aplicaciones alimentarias y no alimentarias. Este estudio busca obtener y caracterizar carboximetil celulosa (CMC), donde se utilizó la metodología de superficie de respuesta para optimizar la producción de celulosa en hojas de pasto elefante, King Grass Verde y King Grass Morado, utilizando hidróxido de sodio (NaOH) como aislante y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como un agente quelante para minimizar las cenizas. Las variables independientes fueron % NaOH y % EDTA, con dos parámetros constantes, la temperatura de (80-90 ° C) y el tiempo (120 min). Las variables dependientes fueron el rendimiento de celulosa, el contenido de cenizas y el contenido de  $\alpha$ -celulosa. Las condiciones óptimas se definieron por: concentración de NaOH al 25%, concentración de EDTA al 10%. El rendimiento de celulosa fue del 34,91%, el contenido de  $\alpha$ -celulosa del 80,15% y el contenido de cenizas del 2,20%. Para obtener CMC, la % NaOH y peso de ácido monocloroacético (MCA) se estudiaron como variables independientes. Las variables dependientes fueron el rendimiento de CMC, grado de sustitución y grado de pureza, aplicando el mismo principio de condiciones de superficie de respuesta: NaOH al 50%, 2g de MCA. El CMC de King Grass Verde obtuvo mejores resultados, con un rendimiento final de 1,89 g/g, 0,77 grados de sustitución, grado de purificación de 95,39% y 40,73 mPas. Concluyendo que CMC se puede obtener de forrajes.


**Palabras Claves:** Hoja, Tallo, King Grass Morado y Verde, Pasto Elefante, Celulosa, Carboximetil Celulosa y Superficie de Respuesta



## ABSTRACT

Forages have cellulose in their structure with food and non-food. applications This study seeks to obtain and characterize carboxymethyl cellulose (CMC) where the response surface methodology was used to optimize cellulose production in leaves of elephant grass, Green King Grass and Purple King Grass, using sodium hydroxide (NaOH) as an insulator and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as a chelating agent to minimize ash. The independent variables were % NaOH and % EDTA, with two continuous parameters, the temperature of (80-90 ° C) and time (120 min). The dependent variables were cellulose yield, ash content and  $\alpha$ -cellulose content. Optimum conditions were defined by: 25% NaOH concentration, 10% EDTA concentration. The cellulose yield was 34.91%,  $\alpha$ -cellulose content 80.15%, and ash content 2.20%. To obtain CMC, % NaOH and weight of Monochloroacetic Acid (MCA) were studied as independent variables. The dependent variables were CMC yield, degree of substitution and degree of purity, applying the same principle of response surface conditions were: 50% NaOH, 2g of MCA. The CMC of Green King Grass was better results, with a final yield of 1.89 g/g, 0.77 degrees of substitution, degree of purification of 95.39% and 40.73 mPas. Concluding that CMC can be obtained from forages.

**Key Words:** Leaf, Stem, Purple and Green King Grass, Elephant Grass, Cellulose, Carboxymethyl Cellulose and Response Surface.

  
Reviewed by: Gallegos, Lorena  
Language Center Teacher



## INTRODUCCIÓN

Los Forrajes constituyen el alimento básico de consumo en el sector Agropecuario, el material lignocelulósico de los forrajes es una de las alternativas para agregar valor y es bien conocida en aplicaciones industriales alimentarias como también en el sector químico y energético, el cual ha ido en constante aumento ya que son fuentes renovables donde se busca sustituir la utilización de reservas fósiles. La celulosa, lignina y hemicelulosa componen los polímeros de las masas lignocelulósicas, estos se separan por fraccionamiento para luego ser purificados, por lo tanto aparece la necesidad de encontrar maneras apropiadas de convertir estas propiedades en productos útiles (Barba, 2002).

Varios estudios de investigación publicados en la literatura revelaron que forrajes como King Grass y Pasto Elelefante son una materia prima valiosa para la obtención de diversos productos, tales como bioetanol (Cardona et al, 2013), azúcares fermentables (Guanha et al. 2014), proteínas solubles (Urribarrí et al. 2004) y un hidrolizado detoxificado (Castillo, 2014).

Hojas y tallos de estos forrajes pueden utilizarse como materia prima para la producción de celulosa, pero hasta ahora se ha prestado poca atención a esta trayectoria de recuperación en forrajes. Los pocos datos disponibles en la literatura muestran el aislamiento de celulosa en bagazo de caña de azúcar, (García et al. 2013 y Gamboni et al. 2010) en hojas de Palma de Aceite (Tasaso, 2015), en madera y algodón (Latif et al. 2007). Se realizaron estudios en condiciones alcalinas para aumentar el contenido de celulosa con hidróxido de sodio (Mustata, 2013), por lo tanto se puede suponer que el aislamiento alcalino de celulosa optimizando parámetros en forrajes no ha sido establecido. Además se ha reportado que el contenido de cenizas en la obtención de celulosa ha sido un problema para aplicaciones químicas, en papel y celulosa (Ververis, 2007). La presente investigación sobre la recuperación de celulosa en condiciones alcalinas se amplió con un estudio complementario con el objetivo de disminuir el contenido de cenizas

utilizando un agente quelante, Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Sin embargo, las aplicaciones de celulosa todavía se han limitado debido a que es ligeramente opaco e insoluble en agua. La modificación de la celulosa es uno de los métodos que pueden mejorar las propiedades físicas y químicas de este material lignocelulósico. Carboximetil Celulosa (CMC) atraído mucha atención en los últimos años (Rachtanapun et al. 2012).

El CMC se obtiene mediante una reacción entre celulosa y ácido cloroacético en una condición alcalina. La preparación de CMC implica dos etapas de reacción, que son un proceso de alcalinización y una eterificación. En el procedimiento de alcalinización, el hidróxido de sodio reacciona con los grupos hidroxilo de celulosa en presencia del disolvente inerte (etanol o isopropanol), que actúa como un agente de hinchamiento y un diluyente que facilita una buena penetración a la estructura cristalina de la celulosa y hace disponible los grupos de hidroxilo para la reacción de eterificación. El proceso de alcalinización se realiza generalmente a temperatura ambiente. En la etapa de eterificación, la celulosa alcalina reacciona con ácido monocloroacetato (NaMCA), o como ácido libre, ácido monocloroacético (MCA) para formar éteres de carboximetilcelulosa (Tasaso, 2015).

Sin embargo es importante tomar en cuenta el origen de celulosa para establecer las condiciones óptimas en la obtención de CMC. La literatura disponible más cercana sobre la aplicación de forrajes es la del bagazo de caña de azúcar (Gamboni et al. 2010), y la de plantas anuales (Barba, 2002). En este proyecto se estudió las diferentes cargas de Hidróxido de Sodio como de Ácido Monocloracético en los distintos forrajes. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo son: a) Determinar la composición química (celulosa, hemicelulosa y lignina) de los forrajes pasto de Elefante y King Grass. b) Determinar un método de laboratorio y fracción en los forrajes, adecuados para aislar la celulosa y carboximetilcelulosa a partir de King Grass y Pasto Elefante, mediante el uso de hidróxido de sodio como agente de cocción. c) Obtener carboximetil celulosa mediante tratamientos químicos de mercerización, eterificación y procesamiento de materia prima. d) Caracterizar el Carboximetil celulosa obtenido para evaluar la influencia

sobre el rendimiento, grado de sustitución y grado de pureza. e) Aplicar el carboximetil celulosa (CMC) como espesante en un alimento agroindustria.

Este trabajo se encuentra documentado en seis capítulos, los cuales son:

El Primer Capítulo contiene la fundamentación teórica sobre la composición química de los forrajes, las propiedades y usos que poseen los mismos.

En el Segundo Capítulo se expone la metodología aplicada en la investigación, detallando los materiales, reactivos, equipos, métodos y procedimientos a seguir en el presente estudio.

En el Tercer y cuarto Capítulo se presentan los resultados obtenidos luego del trabajo de campo realizado, como también las comparaciones de los datos obtenidos con otros estudios.

El Quinto Capítulo revela las conclusiones que se obtuvieron del estudio como también las recomendaciones para mejorar el estudio del problema planteado.

El Sexto Capítulo presenta la propuesta como una alternativa de solución y un estudio profundo en viscosidad del espesante.

## CAPÍTULO I

### 1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

#### 1.1. ANTECEDENTES

La información sobre la obtención de este aditivo resulta ser abundante pero partir de otro tipo de materia prima de las cuales se citan las siguientes:

Para la obtención de este espesante es necesario aislar la celulosa donde Romero y Marfisi obtuvieron celulosa microcristalina a partir del pseudotallo y pinzote de la planta de cambur (*Musa sapientum*), utilizando un procedimiento de siete etapas: 1) Preacondicionamiento de las fibras del pseudotallo y pinzote; 2) Extracción Soxhlet con tolueno-etanol, y 3) Lavado con agua caliente; 4) Tratamiento con solución ácida de  $\text{CH}_3(\text{COOH})$  al 80% m/m y de  $\text{HNO}_3$  al 65% m/m a 110 y 120°C; 5) Tratamiento con solución alcalina (NaOH y KOH al 10 y 20% m/m), 6) Lavado, filtrado y secado; 7) Molienda y tamizado. La absorción correspondientes a la lignina cuando la microcelulosa provenía del pseudotallo tratado a 110°C en medio ácido, igualmente para el pinzote a 120°C fue los que mejores resultados obtuvieron (Romero et al. 2014).

A partir de una planta acuática conocida como Lemna, se obtuvo Carboximetil celulosa a donde se realizó el análisis físicoquímico, obteniendo valores de humedad, celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas y cenizas. Luego se estandarizó el método de extracción de la celulosa, donde buscaron disolver la lignina y hemicelulosa para liberar la celulosa, lo que se logró a partir de un proceso de cocción con NaOH utilizando diferentes tiempos, temperaturas y concentraciones. Obtuvieron fibra de celulosa y una disolución de color negro la que fue filtrada y blanqueada. Lavaron nuevamente la fibra y la secaron a 60°C en la estufa. Para la obtención del aditivo carboximetil celulosa, se mezcló la celulosa obtenida con isopropanol,

agitando la mezcla para homogenizar la suspensión. Se adicionó NaOH a diferentes concentraciones : 5, 15, y 25 % m/v. agitando por 30 minutos a temperatura ambiente, luego colocaron lentamente el ácido monocloroacético durante 30 minutos, calentando a 55°C por 3 horas. Filtraron el carboximetilcelulosa lavando la fibra con etanol del 70 % v/v. Obteniendo una masa constante y secando en la estufa. Las condiciones de extracción de la celulosa de la planta acuática con el mayor rendimiento fue de 44,05%, con: 300 minutos, a 70 °C a una concentración de 8% de hidróxido de sodio y relación sólido-líquido 1:20 (Jiménez et al. 2011).

Dentro del grupo de forrajes Gamboni y Sánchez estudiaron la optimización del proceso de carboximetilación de celulosa proveniente de las fibras de celulosa del bagazo de caña de azúcar para obtener carboximetil celulosa por el proceso de eterificación en fase heterogénea de las fibras. Utilizaron fibras de celulosa no blanqueadas, NaOH y ácido monocloroacético y obtuvieron una pureza de 87%, con una concentración de NaOH del 55% y una relación de ácido monocloroacético – fibra de celulosa igual a 2, el CMC obtenido es soluble en agua a soluciones del 1,5% y 3%. Donde concluyeron que utilizando fibras no blanqueadas se obtiene un CMC de grado crudo. (Gamboni et al. 2010)

Terán y Escalera obtuvieron carboximetil celulosa usando leña como materia prima y establecieron tres etapas: El hinchamiento de la celulosa, la eterificación y la purificación. En las dos primeras etapas se realizaron variaciones con el tiempo, temperatura y concentración, encontrando diferencias en la calidad del producto. Las condiciones óptimas de procesamiento para obtener un producto con calidad superior fue con un grado de sustitución de 0,72 a 0,96; la viscosidad dinámica de 11000 a 21000 cp a 11,3 de gradiente de velocidad y pureza > 98%, esta es la calidad que corresponde a CMC de grado purificado hasta grado alimenticio farmacéutico (Terán & Escalera, 2007).

## 1.2.ENFOQUE TEÓRICO

### 1.2.1. PASTO ELEFANTE (*Pennisetum purpureum Schum*)

Es una planta perenne que produce pastizal abierto en forma de macollas, de tallos erectos, recubiertos por las vainas de las hojas en forma parcial o total. Las hojas son lanceoladas y pueden alcanzar una longitud de un metro, variando su ancho entre 3 y 5 centímetros. La inflorescencia se forma en los ápices de los tallos y es sostenida por un largo pedúnculo. La panícula es dorada, de forma cilíndrica, compuesta de espiguillas aisladas o reunidas en grupos de 2 a 7. La altura varía según la estación y la fertilidad del suelo, pero una altura promedio durante el período de invierno es de 1,67 metros a los 60 días después del corte. En plantaciones más viejas se han encontrado alturas superiores a los 4,5 metros (S. Rodríguez, 2007). En zonas altas el corte se puede realizar cada 120 días, pero en zonas bajas cada 45 días.

Tabla 1. Taxonomía de Pasto Elefante

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Clase:</b>	Angiospermae
<b>Orden:</b>	Glumiflorae
<b>Familia:</b>	Graminaceae
<b>Nombre común</b>	Pasto elefante
<b>Nombre científico</b>	<i>Pennisetum purpureum</i>
<b>Otros nombres</b>	Elefante, búfala, hierba de napier, gigante.
<b>Consumo</b>	Pasto de corte.
<b>Clima favorable</b>	Cálido, entre 0 y 1.700 m.s.n.m.
<b>Tipo de suelo</b>	Se da mejor en suelos fértiles aunque se adapta a suelos de baja fertilidad.
<b>Tipo de siembra</b>	Por material vegetativo,
<b>Plagas y enfermedades</b>	Atacado por gusanos, candelilla y bachacos.
<b>Tolera</b>	Suelos ácidos, sequía

Fuente: (Bemhaja 2000).

El pasto elefante, pasto de Napier o pasto de Uganda, es una especie de la familia Poaceae nativa de las planicies tropicales de África. Es una perenne alta, de 2 a 4,5 m (raramente supera los 7,5 m), con hojas aserradas de 30 a

120 cm de longitud y 1 a 5 cm de ancho. El nombre hierba de elefante deriva del hecho de que es el alimento favorito de estos animales. Son plantas perennes cespitosas; con tallos de hasta 800 cm de largo y 10–25 mm de ancho, erectos, en general esparcidamente ramificados, las bases decumbentes; entrenudos sólidos, generalmente glabros, nudos glabros o hispídos. Vainas ligeramente carinadas, glabras o hirsutas; lígula 1.5–3.5 mm de largo, una membrana ciliada; láminas hasta 125 cm de largo y 40 mm de ancho, aplanadas, glabras o pilosas. Inflorescencia compuesta, las espigas terminales y axilares, espigas hasta 30 cm de largo y 10–20 mm de ancho, amarillas o raramente purpúreas, raquis estriado, piloso, recto, con obvias bases de los estípites. Tiene muy alta productividad, tanto para forraje para el ganado como para su uso como biocombustible. (Mundo Pecuario, 2015).

### **1.2.2. KING GRASS (*Pennisetum hybridum*)**

Usualmente alta de 2 – 3m, la variedad Enano alcanza 1.5 m. Las hojas tienen de 30 a 70 cm de largo; la panícula es parecida a una espiga dura y cilíndrica de 30 cm de largo. Forma macollas y tiene rizomas. Crece bien desde nivel de mar hasta 2200 m, su mejor desarrollo se tiene a 1500 m.s.n.m.; la variedad Taiwán tiene adaptación hasta 2300 m. Crece bien, bajo temperaturas de 18 a 30° C, con el óptimo a 24° C. Se comporta bien en suelos ácidos a neutros, resiste sequía y humedad alta y una precipitación entre 800 y 4000 mm anuales (Cardona et al. 2013). Existen dos variedades de King Grass con el mismo nombre científico (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*), que se diferencian por el color, existe un King Grass Verde que tiene mayor carga foliar y posee mayor altura y grosor en el tallo. King Grass Morado que posee menor cantidad de hojas como menor espesor en tallos. (Roncallo, A, and Castro, 2012).

Como todos los *Pennisetum*, acumula biomasa hasta los 5-6 meses. Este clon a medida que envejece acumula menos cantidad de lignina que el resto de los *Pennisetum*. Se cosecha a los 60 días debido a que los 90 días de edad la composición del pasto se ve afectada. Se ha demostrado que el King Grass es el cultivar de género *Pennisetum* con mayor rendimiento anual de materia seca (20 a 28 t/ha). (Finkeros.com, 2013).



Tabla 2. Taxonomía de King Grass

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Clase:</b>	Angiospermae
<b>Orden:</b>	Glumiflorae
<b>Familia:</b>	Graminaceae
<b>Nombre Común</b>	King Grass
<b>Nombre Científico</b>	Pennisetum Hybridum
<b>Otros nombres</b>	King Grass CT-115
<b>Consumo</b>	Pasto de corte.
<b>Clima favorable</b>	Cálido, entre 0 y 1.700 m.s.n.m.
<b>Tipo de suelo</b>	Se da mejor en suelos fértiles aunque se adapta a suelos de baja fertilidad.
<b>Tipo de siembra</b>	Por material vegetativo,
<b>Plagas y enfermedades</b>	Atacado por gusanos, candelilla y bachacos.
<b>Tolera</b>	Suelos ácidos, sequía

Fuente: (Chacón, P; Vargas 2009)

### 1.2.3. CARACTERIZACIÓN DE FORRAJES

En la Tabla 4 se presenta una recopilación de datos bibliográficos sobre la composición química de los forrajes que se estudian en este trabajo.

Tabla 3. Carbohidratos presentes en los Forrajes

Carbohidratos del Tejido Vegetal	Estructurales (Pared Celular)	Celulosa
		Hemicelulosa
		Lignina
		Nitrógeno ligado a la pared celular
		Sílice
		Sustancias Pécicas
	No estructurales (Contenido Celular)	Monosacáridos
		Disacáridos
		Trisacáridos
		Almidones
		Otros Carbohidratos Solubles

Fuente: (Robles 2009).

La pared celular de las plantas superiores está constituida por la lámina media, pared primaria y pared secundaria. Los componentes químicos de estas capas tiene una determinada organización lo que origina dos fases: Microfibrilar y amorfa. Las paredes son químicamente complejas porque se encuentran

constituidas por una mezcla de carbohidratos, proteínas, lignina, agua, iones, moléculas inorgánicas y en algunos casos cutina y suberina.(Robles,2009).

Tabla 4. Composición química de King Grass Morado, Verde y Pasto Elefante.

Componente	Tipos de Forrajes		
	KG MORADO	KG VERDE	PASTO ELEFANTE
Materia Seca (%)			
Hoja	10,7	16,66	18,4
Tallo		12,05	
Cenizas %			
Hoja	7,47	16,09	
Tallo		11,94	
Fibra Detergente Neutro (FND %)			
Hoja	71,4	74,30	77,62
Tallo		80,86	
Fibra Detergente Ácido (FAD%)			
Hoja	44,8	46,51	44,28
Tallo		54,54	
Celulosa %			
Hoja	34,38	36,76	39,1
Tallo		38,51	
Hemicelulosa %			
Hoja	26,6	27,79	33,2
Tallo		26,21	
Lignina %			
Hoja	12,15	9,76	6,41
Tallo		16,13	

Fuente: ((Robles 2009) ,(Segura, Echeverri, and Mejía, 2008),(Castello et al. 2012).

#### 1.2.4. FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS

Los materiales lignocelulósicos están constituidos por celulosa, lignina y hemicelulosa en una relación aproximada de 4:3:3 variando según las diferentes especies, gracias a su origen renovable, a la biodegradabilidad de sus derivados y sus posibilidades de reciclaje, son una fuente idónea de materiales poliméricos de interés industrial. Existe una gran variedad de fuentes lignocelulósicas disponibles, siendo la madera el más utilizado a escala mundial. En las regiones donde existe carencia de bosques, se ha desarrollado la producción de otros tipos de fibras que generalmente son llamados “fibras naturales, término que es utilizado para fibras que proceden de plantas anuales o forrajes. Las principales dificultades que presentan la explotación de este tipo de materiales son su recolección y el almacenaje.

Recientemente, el interés por encontrar nuevos usos para fibras procedentes de cosechas ha ido aumentando debido a la sobreproducción de residuos agrícolas y del área alimenticia. Si se comparan con la madera, las plantas no madereras generalmente tienen un menor contenido en lignina y mayor en sílice y cenizas, mientras que el contenido en celulosa es equivalente. (Terán, E; Escalera, 2007).

### **1.2.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS**

Además de la composición química de las fibras depende de su fuente de origen pero de una manera general se puede decir que poseen una parte mayoritaria que corresponde a la celulosa, entre 40 y 50%, entre un 10 y 30% de lignina y de 20 a 30% de hemicelulosa, sin embargo existe variedad en composición según las diferentes especies. Las cenizas varían de una manera sustancial cuyo contenido es superior a 1%. (Barba, 2002).

Las paredes celulares o Fibra Detergente Neutro (FDN) están constituidos principalmente de celulosa, hemicelulosa, proteína, y lignina; además cantidades pequeñas de pectina, grupos acetilos y constituyentes fenólicos. (Robles, 2009).

### **1.2.6. PRODUCTOS DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO**

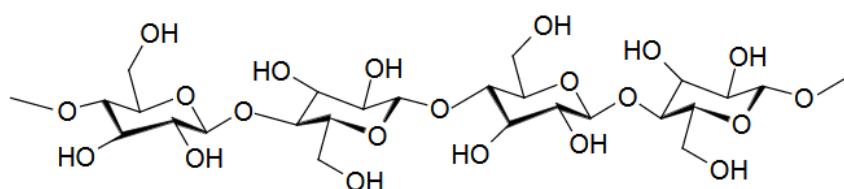
#### **1.2.6.1.CELULOSA**

La celulosa es un polímero lineal simple que consiste en una unidad de anhidroglucopiranososa (AGU) unida entre sí con enlaces  $\beta$ - (1,4) - glucósidos formados entre el carbono 1 y el carbono 4 de la glucosa adyacente. Cada una de las unidades de AGU consiste en tres grupos hidroxilo en las posiciones de carbono 2, 3 y 6. La celulosa está alineada paralelamente entre sí en fibrillas, que están rodeadas por una matriz de lignina y hemicelulosa. Además, la celulosa tiene propiedades tales como: baja densidad, buenas propiedades mecánicas, así como la biodegradabilidad (Mogollón, García, and León 2012). La celulosa se divide en tres tipos: Alfa-celulosa, que corresponde a la celulosa propiamente; Beta-Celulosa: Celulosa degradada (acortada) y un pequeño porcentaje de hemicelulosa; Gamma-

Celulosa; principalmente hemicelulosa, lignina, cenizas como compuestos de silicio; y extraíbles que consisten en ácidos resinosos y ácidos grasos (Saenz, 2013).

La celulosa natural se encuentra generalmente en forma de microfibrillas que se organizan en fibras, paredes celulares y otros. En las microfibrillas de celulosa, las cadenas de celulosa están alineadas paralelamente al eje de la microfibrilla mientras que en las fibras de celulosa las cadenas de celulosa son organización ultraestructural y orientación de las microfibrillas responsables de su resistencia mecánica.(Norrihan 2008).

Gráfico 1. Estructura de Celulosa.



Fuente: (Norrihan 2008).

#### 1.2.6.2.AISLAMIENTO DE CELULOSA

Los métodos de separación de celulosa implican tratamientos con agente quelantes. La desincrustación se puede realizar por extracción con alcoholes inferiores (metanol o etanol), o simplemente con agua caliente, pero, este proceso es parcial, es decir se elimina una fracción soluble. La fracción insoluble, compuesta de protopectina, ácido pécico y sales de calcio y magnesio, sólo se elimina por agentes quelantes (EDTA). Al mismo tiempo, el agente de desincrustación también disuelve la lignina y la fracción proteica en la composición de estos forrajes. Por lo general, el hidróxido de sodio (sosa) es el que ha ganado una mayor difusión como producto químico para el proceso de cocción. El papel del hidróxido de sodio es solubilizar la lignina destruyendo su estructura química y romper los enlaces éster formados en la pared celular entre los grupos carboxilo pertenecientes a las sustancias acompañantes (predominantemente protopectina) y los grupos hidroxilo de hemicelulosa y celulosa, para permitir la quelación. Se ha encontrado que solamente la combinación de hidróxido de sodio - EDTA reduce fuertemente

el contenido de cenizas de celulosa extraída de los forrajes. Ni el hidróxido de sodio ni el EDTA, tomados solo, son capaces de proporcionar tal rendimiento (Mustata, 2013).

### **1.2.6.3.USOS Y APLICACIONES DE CELULOSA**

Los biocompuestos que consisten en polímeros y las fibras celulósicas naturales son materiales amigables con el medio ambiente que pueden reemplazar los polímeros reforzados con fibra de vidrio y actualmente se usan en una amplia gama de campos tales como las industrias automotriz y de construcción, componentes electrónicos, deportes y ocio. También se pueden usar para hacer aerogeles y espumas, ya sea de manera homogénea o en formulaciones compuestas. Las espumas a base de nanocelulosa están siendo consideradas para aplicaciones de envasado como una alternativa a las espumas a base de poliestireno.(Mashego 2016).

Papel y cartón: Tienen una aplicación potencial en la industria del papel y del cartón donde pueden aumentar la resistencia de las fibras y aumentar así la resistencia del papel. También pueden utilizarse como barrera en papeles a prueba de grasa y como aditivo final en húmedo para mejorar la retención, la resistencia en seco y en húmedo en productos de papel y cartón de productos básicos (Hubbe et al. 2008).

Alimentos: Como un espesante de alimentos, nanocelulosa puede ser utilizado como un reemplazo de baja en calorías para los aditivos de carbohidratos, como un sabor de soporte y estabilizadores de la suspensión. Las aplicaciones alimentarias de celulosa fueron una de las primeras aplicaciones de la nanocelulosa debido al comportamiento reológico del gel nanocelulósico.(Mashego 2016).

Productos higiénicos y absorbentes: Las diferentes aplicaciones en este campo incluyen pero no se limitan a: Supe absorbente de agua , nanocelulosa usada junto con polímeros súper absorbentes, nanocelulosa en tejidos, productos no tejidos o estructuras absorbentes y películas antimicrobianas.(Mashego 2016).

Medicina, cosmética y farmacéutica: Se ha sugerido una amplia gama de aplicaciones de gama alta: Aerogeles de celulosa liofilizados utilizados en compresas sanitarias, tampones, pañales o como vendajes para heridas, como un agente de recubrimiento compuesto en cosméticos. Una composición de celulosa sólida seca en forma de comprimidos para tratar trastornos intestinales, es un medio filtrante parcialmente basado en celulosa para la transfusión de sangre libre de leucocitos, formulación bucodental, que comprende en celulosa y un compuesto orgánico polihidroxilado y geles elásticos para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas potenciales. (Mashego 2016).

#### **1.2.6.4. CARBOXIMETIL CELULOSA**

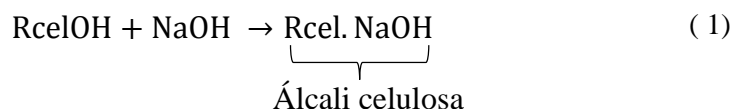
Carboximetil celulosa (CMC) es una sal soluble en agua. Es el principal éter de celulosa producido industrialmente. Gracias a su carácter hidrofílico, la alta viscosidad que produce en soluciones, aún a bajas concentraciones, sus buenas propiedades para formar películas, inocuidad y excelente comportamiento como coloide protector y adhesivo, su uso se ha extendido en diferentes industrias. Por esta razón, se produce en grandes cantidades en grado comercial, crudo, sin ningún refinamiento, para emplearla en detergentes, fluidos de perforación y en la industria papelera. El refinamiento se efectúa para aplicaciones como aditivo alimenticio y farmacéutico. Su producción en gran escala es más simple que la de otros éteres de celulosa; debido a que los reactivos empleados permiten trabajar a presión atmosférica, por ser sólidos o líquidos. Normalmente el CMC se produce a partir de celulosa proveniente de capullos de algodón, cuyo porcentaje de celulosa es algo mayor que el 90%. En general, el grado de sustitución promedio de la CMC se encuentra entre 0,5 – 1,5. Para CMC de grado crudo el DS varía entre 0,4 y 0,9 y su pureza entre 60 a 80%. (Gamboni et al. 2010).

#### **1.2.6.5. OBTENCIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA**

La Carboximetil celulosa se obtiene mediante dos reacciones consecutivas: la formación de álcali-celulosa Ec. 1, mediante la reacción de

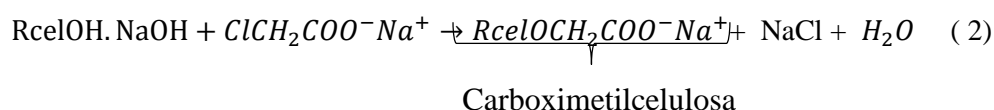
la celulosa con hidróxido de sodio, llamada alcalinización, hinchamiento o mercerización.

Ecuación 1. Formación de Álcali Celulosa.



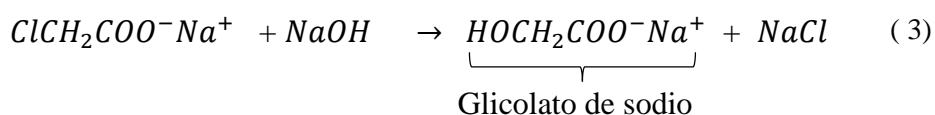
Y la eterificación de álcali-celulosa Ec.2, mediante la reacción con cloroacetato de sodio o ácido monocloroacético.

Ecuación 2. Formación de Carboximetil Celulosa.



A diferencia de lo que sucede en la preparación de éteres de celulosa a partir de epóxidos, en la reacción de álcali celulosa con cloroacetato de sodio se consume sosa para formar cloruro de sodio. Por esta razón es necesario adicionar inicialmente un exceso de álcali o bien reposarlo en etapas posteriores de reacción. Además existe una reacción secundaria Ec.3, en la que se forma glicolato de sodio como subproducto.

Ecuación 3. Formación de Subproductos.



En la reacción (1), las fibras de celulosa se hinchan en soluciones altamente concentradas de NaOH y se producen cambios visibles en el área de la sección transversal de las fibras durante este proceso, la que presenta una forma ovalada después del hinchamiento. (Terán, 2007).

#### 1.2.6.6.APLICACIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA

Carboximetilcelulosa, es un tipo de celulosa que son los alimentos más ampliamente utilizados, cuidado personal, detergente, flotación minera, fabricación de papel, perforación de petróleo y textiles En el mundo debido a sus propiedades importantes, tales como alta viscosidad, preservación del agua, buena resistencia ácida y resistencias a la sal. Construcción: Se utiliza

en composiciones de cemento y materiales de construcción, ya que actúa como un estabilizador y agente hidrófilo. Detergente: Se usan para jabones y detergentes, actuando como un inhibidor de grasa en la tela después de haber sido eliminado el detergente. Papel: El revestimiento de CMC reduce el consumo de cera en papel encerado y cartón asegurando una menor penetración de la cera en papel. Agricultura: En los pesticidas y aerosoles a base de agua, donde el CMC actúa como un agente de suspensión y pegamento para unir el insecticida a las hojas. Se utiliza en la industria Textil, farmacéutica, plástico, cerámica y en especial en la alimentaria como se trata en este estudio. (Quiminet, 2012).

#### **1.2.6.7. MÉTODO SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR)**

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), fue introducida por Box y Wilson que permite al investigador evaluar los efectos que producen a la respuesta al variar factores cuantitativos, donde se encuentran valores óptimos a las variables independientes para maximizar, minimizar o que cumplan ciertas restricciones en la variable respuesta (Figuroa, 2003). La Representación matemática de los modelos MSR pueden ser de diversas formas dependiendo del número de factores estudiados. La superficie de respuesta y sus curvas de nivel, que son las líneas con valores iguales de respuesta, se podrían representar con gráficas de contorno y gráficas de superficie 3D. El modelo de segundo orden Ec.4 de dos factores se presenta a continuación:

Ecuación 4. Modelo lineal ajustado de segundo orden de dos factores.

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \hat{\beta}_{11} x_1^2 + \hat{\beta}_{22} x_2^2 + \hat{\beta}_{12} x_1 x_2, \quad (4)$$



## **CAPÍTULO II**

### **2. METODOLOGÍA**

#### **2.1. TIPO DE ESTUDIO**

El presente trabajo reúne las condiciones metodológicas de una investigación experimental, debido a que se utilizaron conocimientos de Análisis químico, a fin de aplicarlas en la caracterización y obtención de Carboximetil Celulosa a partir de forrajes.

Como punto de partida se realizó la caracterización en hojas y tallos del material lignocelulósico en Materia Seca, Cenizas, Fibra Detergente Ácido, Fibra Detergente Neutro, Hemicelulosa, Celulosa y Lignina. Realizando 4 réplicas de los análisis mencionados se evaluó con un ANOVA y un análisis de diferencias significativas por el método de Tukey.

Se aplicaron dos diseños experimentales utilizando como materia prima hojas de King Grass Verde, por su contenido de celulosa y su menor cantidad de lignina que el tallo:

1. Diseño experimental para el estudio de la influencia de las condiciones de proceso de Celulosa y Carboximetil Celulosa.

**CELULOSA:** En este caso se trabajó con sistemas de igual composición y se varió las concentraciones de Hidróxido de Sodio (10, 20, 25 y 30%) y de Ácido Etilendiaminotetracético ( 5, 7.5 y 10%). Con una temperatura entre 80-90°C en un tiempo de cocción de 120 minutos.

**CARBOXIMETIL CELULOSA:** Se realizaron estudios con diferentes concentraciones de Hidróxido de Sodio ( 40,50 y 60%) y Ácido Cloracético (1,2 3 g), para conocer la concentración óptima en el proceso de obtención. En los estudios se trabajó con 2 g de muestra de celulosa y a condiciones constantes de temperatura 70°C y 180 minutos.

De cada experimento se realizó cuatro réplicas para celulosa como para carboximetilcelulosa, además se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con el test de comparaciones múltiples de Tukey con  $P < 0,05$ .

2. Diseño experimental para el estudio de la influencia de las variables independientes en la obtención de celulosa y carboximetil celulosa se utilizó una metodología estadística de superficie de respuesta (MSR).

CELULOSA: Del análisis de los resultados del primer diseño se realizaron análisis de  $\alpha$ -celulosa y cenizas.

CARBOXIMETIL CELULOSA: Se tomaron en cuenta el grado de sustitución y el grado de pureza para el análisis de Superficie de Respuesta.

APLICACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS: Una vez obtenidas las condiciones óptimas, se aplicaron en hojas y tallos de los tres forrajes estudiados.

APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: Se cumplió la aplicación de Carboximetil celulosa de los tres forrajes en un jugo, donde se analizó viscosidad, se comparó con el espesante comercial y el blanco.

## **2.2.POBLACIÓN Y MUESTRA**

Los forrajes seleccionados para la realización del estudio son el King Grass Verde, King Grass Morado y Pasto Elefante. Se evaluaron 6 muestras de las hojas y tallos en los tres forrajes, recolectados en la Granja Avícola “Flor María”, ubicada en la provincia de Chimborazo, recinto Guamanpata en el Km 22 Vía Bucay- Pallatanga. Se realizó un muestreo aleatorio donde se tomaron las muestras de diferentes puntos del cultivo cortando en porciones de 20 cm. Posteriormente fueron lavadas, secadas y trituradas para luego ser remitidas al laboratorio de Calidad de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Nacional de Chimborazo en la ciudad de Riobamba, para su respectivo análisis químico.

### 2.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DESCRIPCIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	ITEMS	INSTRUMENTO / MÉTODO
Forrajes	Independiente	<i>Pennisetum</i> (Forrajes) son gramíneas perennes utilizadas en ganadería para la alimentación.	<i>Pennisetum purpureum</i> (Pasto Elefante)	Madurez	75 días	Molino Balanza
			<i>Pennisetum Hybridum</i> (King Grass)			
Caracterización	Independiente	Los Polímeros celulosa, hemicelulosa y lignina son carbohidratos que se encuentran en la pared celular de las plantas y proporciona rigidez.	Total de Pared Vegetal	Fibra Total FDN y FDA(%)	0-100	Fraccionamiento de Van Soest Gravimétrico Gravimétrico
			Hemicelulosa	Hemicelulosa		
			Lignina	Lignina LDA (%)		
			Porcentaje de Agua	Humedad (%)		
			Materia Inorgánica	Cenizas (%)		
Método de Extracción	Independiente	Métodos de Obtención de la Celulosa: Análisis de una muestra para identificar la concentración o propiedades de la misma.	Aislamiento de Celulosa	NaOH, EDTA	NaOH (10,20,25 y 30 %) EDTA (5,7.5,10%) NaClO 5%	Reflujo Estufa
			Blanqueamiento	NaClO		
			Mercerización	Isopropanol		
			Eterificación	NaOH y MCA	NaOH (40,50,60%) y MCA (1,2 y 3 g)	
			Complementos y Lavados	Metanol, Etanol y Ácido Acético Glacial		Medidor de pH, Balanza Analítica
Aislamiento de Celulosa	Dependiente	Método Alcalino para Aislar celulosa con NaOH – EDTA.	Rendimiento de Celulosa	Rendimiento	%	Reflujo y Balanza Analítica
			$\alpha$ - Celulosa	Contenido	%	
			Cenizas	Rendimiento	%	Reflujo
			Rendimiento de CMC	Contenido	-	
Caracterización de CMC	Dependiente	Obtención de CMC	Grado de Sustitución			
			Grado de Pureza		%	Gravimetría

## 2.4.PROCEDIMIENTOS

Se utilizaron las siguientes técnicas :

Tabla 5. Técnicas del Estudio

<b>TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO</b>	
<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS FORRAJES</b>	
Materia Seca	(Hall,2000).
Cenizas	(AOAC,1995)
Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA) y Hemicelulosa	(Van Soest, P; Robertson and Lewis ,1991)
Lignina y Celulosa	(Van Soest, P; Wine 1991)
<b> AISLAMIENTO DE CELULOSA</b>	
Cantidad de $\alpha$ - celulosa	(Van Soest, P; Wine 1991)
<b>CARACTERIZACIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA</b>	
Grado de Sustitución	(ASTM D1439 - 03, 2004).
Grado de Pureza	
Viscosidad	

Elaborado por: Antonieta Cazco

### 2.4.1. DESCRIPCIÓN DE EQUIPOS Y REACTIVOS

#### 2.4.1.1.REACTIVOS

Tabla 6. Reactivos Utilizados

<b>REACTIVOS</b>	<b>MARCA</b>	<b>PUREZA (%)</b>
Hidróxido de Sodio	Merck	98
EDTA	Baker Analyzed	99
Hipoclorito de Sodio	Sin Marca	5
Ácido Cloracético	Sigma Aldrich	99
Isopropanol	Baker Analyzed	99,5
Metanol	Barker Analyzed	99,8
Etanol	Sin Marca	95
Ácido Acético Glacial	Baker Analyzed	99,7

Elaborado por: Antonieta Cazco

## 2.4.1.2.EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Tabla 7. Equipos e Instrumentos utilizados.

<b>NOMBRE</b>	<b>MARCA</b>
pH - metro	Milwaukee
Balanza Analítica	Metter Toledo
Viscosímetro	NDJ-8S
Estufa	Mammet
Mufla	Thermo Scientific
Equipo de Reflujo	Novatech
Tamices	Grupo ARVAR
Deshidratador de alimentos	EZ store
Procesador	Health Master YD-2088E

Elaborado por: Antonieta Cazco

## 2.5.PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS

### 2.5.1.1.Preparación de la Muestra

Se cortan las cañas de los forrajes en pequeñas piezas de 20 cm, se seca el producto a 60 °C por 6 horas y posteriormente es molido hasta que el tamaño de partículas sea de 250 $\mu$ m que atraviese un tamiz malla 60.

### 2.5.1.2.CARACTERIZACIÓN DE LOS FORRAJES

#### 2.5.1.3.Determinación de Materia Seca (MS)

Se determinó pesando 5 g de material fresco y posteriormente se introdujo en una estufa Memmert con aire forzado a 55° C hasta alcanzar peso constante y por diferencia de peso se obtuvo la MS (Hall,2000).

#### 2.5.1.4.Determinación de Cenizas

Se pesaron 5 g de las muestras y posteriormente se introdujeron en una mufla Thermo Scientific, a una temperatura de 550°C por tres horas o hasta alcanzar peso constante y por diferencia de peso se obtuvo las Cenizas. (Hall, 2000). (AOAC,1995)

#### 2.5.1.5.Determinación de Fibra Detergente Neutro (FDN) y Ácido (FDA)

Se realizó con base a la metodología propuesta por (Van Soest, P; Robertson and Lewis ,1991) empleando detergente neutro (FDN) y ácido (FDA).

### **2.5.1.6. Determinación de Lignina y Celulosa en Fibra Ácido Detergente con Permanganato**

Se analizó la cantidad lignina y celulosa con Permanganato siguiendo el procedimiento de (Van Soest, P; Wine 1991), utilizando la técnica de Fibra Detergente Ácido como primer proceso y continuando con la acción del permanganato.

### **2.5.2. OBTENCIÓN DE CELULOSA**

En el Gráfico 1 se presenta el esquema de aislamiento de aislamiento de celulosa. Obtención de Fibras de Celulosa

Se cocieron 25 g de muestra con 250 ml de NaOH (10%, 20% y 30%) a 80-90°C. Durante 2 horas. Se obtiene una sustancia negra en suspensión el cual se filtra y se lava el residuo sólido con agua destilada a 90°C, hasta que el filtrado resulte transparente y con un pH aproximadamente de 7. El residuo se secó a 70° C hasta que llegue a peso constante por 12 horas.

#### **2.5.2.1. Blanqueado y Secado:**

La celulosa se blanquea con Hipoclorito de Sodio al 5% a temperatura ambiente 19° C , con 2 a 3 lavados hasta que llegue a un color blanco. Se realiza diversos lavados con agua caliente y un lavado final con ácido acético glacial al 10% y se seca a 70° C por 12 horas. Finalmente se muele y tamiza para un tamaño de 250 micras. Se analizó el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina por la técnica propuesta por (Van Soest, P; Wine 1991) de detergente neutro, ácido y permanganato. Para el cálculo de rendimiento de celulosa se utilizó la Ec. 5.

Ecuación 5. Rendimiento de Celulosa

$$Rendimiento\ de\ Celulosa = \frac{Peso\ de\ celulosa(g)}{Peso\ de\ la\ muestra(g)} \times 100 \quad (5)$$

### **2.5.3. OBTENCIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA**

El Esquema de Obtención de Carboximetil Celulosa se siguió en el Grafico 1.

ALCALINIZACIÓN: Con 2 gramos celulosa se colocaron 10 ml de Isopropanol grado reactivo y agitar por 30min. Luego se añade 2 ml de Hidróxido de Sodio a concentraciones de 40, 50 y 60% en los diferentes ensayos y se agita vigorosamente por 30 min a temperatura ambiente.

ETERIFICACIÓN: Posteriormente se añadió poco a poco ácido monocloroacético, empleando relaciones de ácido monocloroacético - FC ( 1,2 y 3 g) y agitar. Se sometió a reflujo durante 180 minutos a 70°C, transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtró y el material fibroso se mezcló con 150 ml de metanol neutralizado por 1 hora . Finalmente se realizaron lavados de ácido acético glacial al 90 % y luego se neutralizó con lavados de etanol al 95%, hasta que el filtrado se encuentre en pH neutro. Finalmente se seca a 70°C por 4 horas en la estufa y se tritura para lograr una granulometría fina.

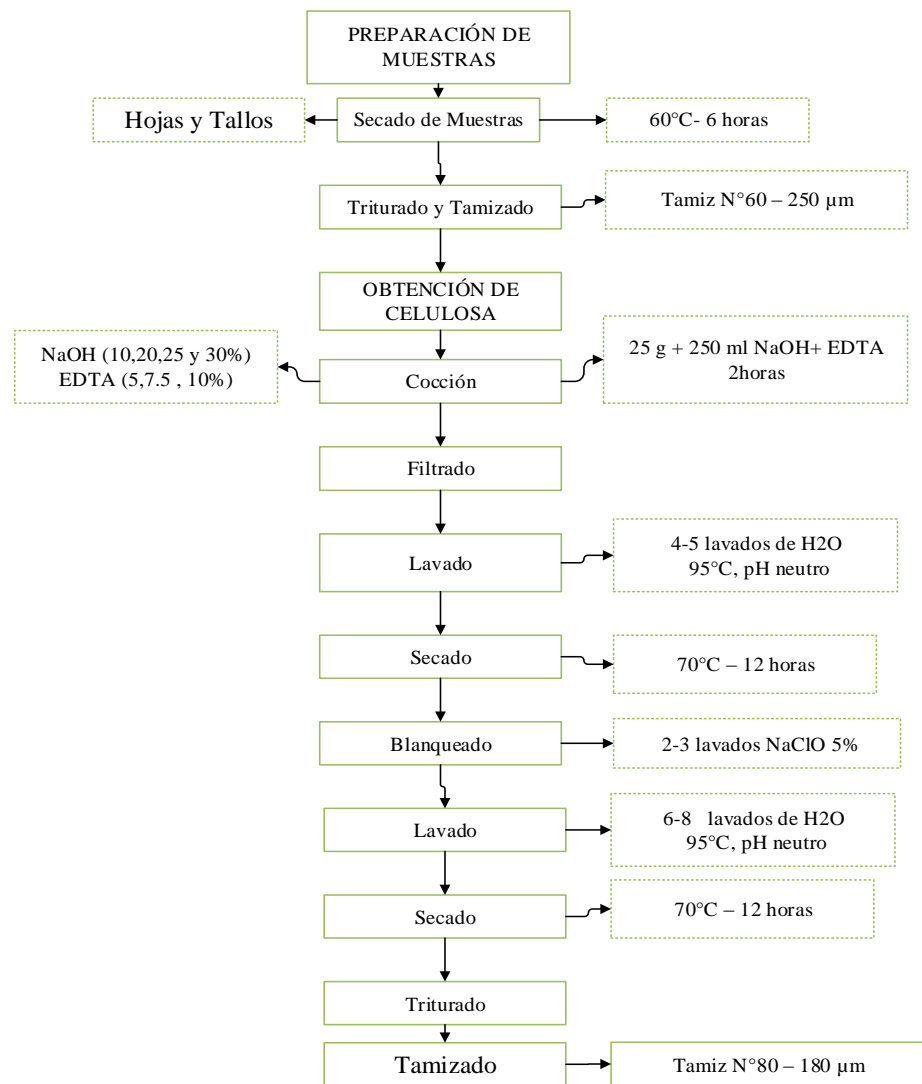
Para calcular el Rendimiento de Carboximetil Celulosa se siguió la Ec. 6.

Ecuación 6. Rendimiento de Carboximetil celulosa.

$$\text{Rendimiento de CMC} = \frac{\text{Peso de CMC (g)}}{\text{Peso de Celulosa (g)}} \quad (6)$$

NOTA: Se expresa el rendimiento de Carboxymetil celulosa en gramos de CMC sobre gramos de celulosa g/g, para mejor entendimiento.

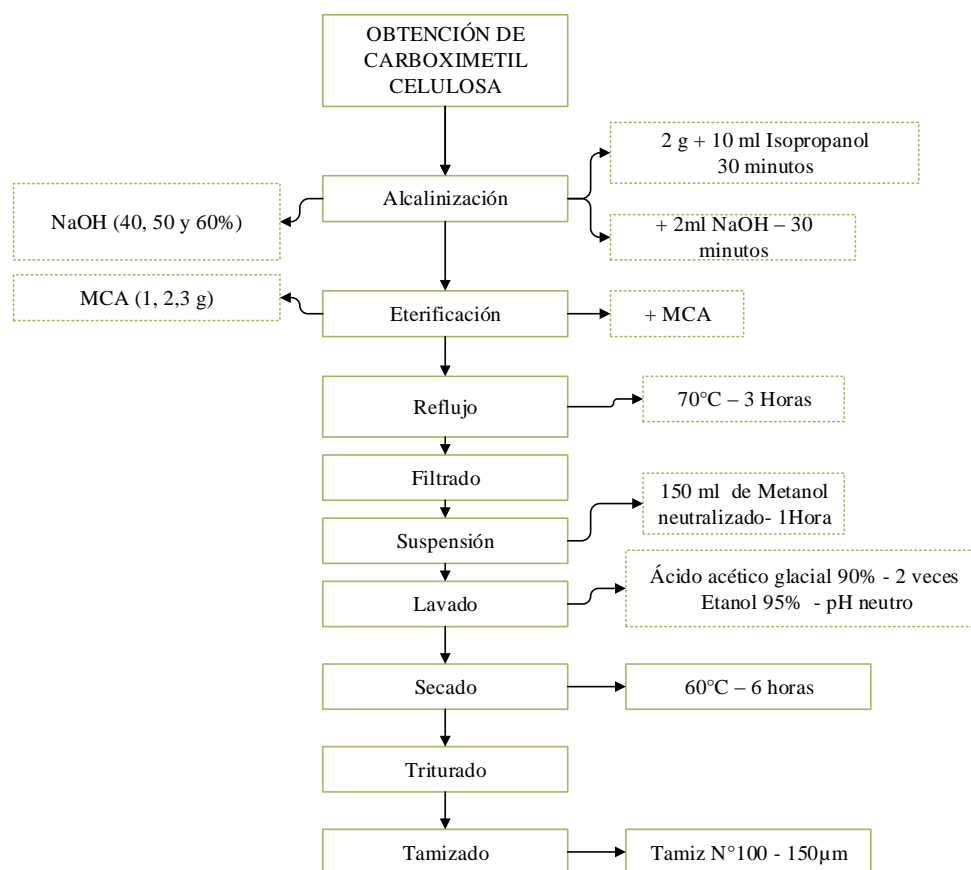
Gráfico 2. Esquema de Aislamiento de Celulosa.



Elaborado por: Antonieta Cazco



Gráfico 3. Esquema de Obtención de Carboximetil Celulosa.



Elaborado por: Antonieta Cazco

## 2.5.4. CARACTERIZACIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA

La carboximetil celulosa obtenida se caracterizó de acuerdo a la norma (ASTM D1439 - 03, 2004).

### 2.5.4.1. GRADO DE SUSTITUCIÓN

Para la determinación del grado de sustitución se pesaron 3 g de cada muestra y se añadieron 75 ml de alcohol etílico (95%). Se agitó hasta obtener una suspensión y se agregó 5 ml de HNO<sub>3</sub>. Se calentó la mezcla hasta ebullición durante 5 min y se continuó la agitación durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Se procedió al filtrado de las fibras y el precipitado se lavó con etanol hasta eliminar el ácido. Por último, se lavó el precipitado con una pequeña cantidad de metanol y se secó, durante 3 horas a 105°C.

Se pesa 1g carboximetilcelulosa ácida, y se añade una solución de NaOH 0,4 N, se calentó hasta ebullición, se mantuvo durante 10 minutos y, mientras la solución aún se encontraba caliente, se valoró el exceso con HCl 0,4 N. Según la norma ASTM D1439-94. Se aplicó la Ec. 7, para el grado de sustitución.

$$A = \frac{BC - DE}{F}$$

Ecuación 7. Grado de Sustitución

$$\text{Grado de Sustitución} = \frac{0.162 \times A}{1 - (0.058 \times A)} \quad (7)$$

Donde

A= miliequivalentes de consumo de ácido por gramo.

B= Volumen de Hidróxido de Sodio añadido

C= Concentración de Normalidad de Hidróxido de Sodio añadido.

D= Volumen de consumo de Ácido Clorhídrico.

E= Concentración en normalidad de Ácido clorhídrico usado.

F= Gramos de muestra utilizados

#### 2.5.4.2. GRADO DE PUREZA

Se pesó 3g de CMC y se agitaron mecánicamente en un vaso de precipitados durante 15 min con una porción de 150 ml de etanol (80% en volumen) a una temperatura de 60 a 65 ° C. Se separó el líquido sobrenadante y luego se procedió al filtrado de las fibras. Se agregó una nueva porción de etanol y se repitió el procedimiento de lavado. La materia no disuelta se secó en estufa a 100°C, se pesó y se calculó el porcentaje de carboximetilcelulosa presente en la muestra con la Ecuación. 8.

Ecuación 8. Grado de Pureza

$$\text{Grado de Puerza} = \frac{\text{Peso de CMC final (g)}}{\text{Peso de CMC inicial (g)}} \times 100 \quad (8)$$

### **2.5.4.3.VISCOSIDAD**

Se realiza una solución del 2% CMC en 250ml de Jugo de Naranja, utilizando un viscosímetro rotacional digital NDJ-8S, usando como referencia el método que especifica la (ASTM D1439 - 03, 2004).

### **2.5.5. MÉTODO SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR)**

El modelo de MSR se aplicó con ecuaciones de segundo orden que corresponde a la Ec 4, para obtener las condiciones óptimas en celulosa y en carboximetil celulosa con gráficas de superficie en 3D. Las gráficas y el análisis se realizaron en el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI.

Se investigó el efecto de la concentración de hidróxido de sodio (Xh) y de EDTA (Xe), sobre el rendimiento de celulosa (Yr), contenido de  $\alpha$ -celulosa (Y $\alpha$ ) y contenido de cenizas (Yc) del producto de celulosa. Basándose en este diseño se llevaron a cabo 12 experimentos de acuerdo con las condiciones indicadas y los valores de respuesta se representan en las tres últimas columnas de la Tabla 9. El modelo de superficie de respuesta se ajustó a las variables de respuestas (Y). Los coeficientes del modelo fueron evaluados por análisis de regresión para las variables respuesta, así como el R<sup>2</sup> correspondiente, y los valores de P se dan junto a las ecuaciones (9), (10) y (11), donde se utilizó la ecuación 4 de segundo orden. Las funciones de respuesta final (variables en valores codificados) se presentan a un nivel de significancia del 95% para predecir el rendimiento de celulosa, contenido de  $\alpha$  celulosa y el contenido de cenizas del producto de celulosa. El modelo se lo aplicó utilizando únicamente con hojas de King Grass Verde debido a que poseen menor material lignocelulósico que los tallos.

Para la obtención de Carboximetil celulosa se estudió el efecto de concentración de NaOH y MCA, sobre el rendimiento de CMC (Ym) en la ecuación (12), grado de sustitución Ys (13) y grado de pureza Yp,(14) donde se llevaron a cabo 9 experimentos que se presentan en la Tabla 11.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS

#### 3.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS FORRAJES KING GRASS VERDE, KING GRASS MORADO Y PASTO ELEFANTE

La caracterización se realizó con una edad de 75 días, la Tabla 8 muestra los valores de materia seca (MS) y diferentes componentes estructurales como Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA), hemicelulosa, celulosa, lignina, y cenizas, en hojas y tallos de los forrajes KG Verde, KG Morado y Pasto Elefante.

Tabla 8. Caracterización de KG Morado, KG Verde y Pasto Elefante.

Componente	KG	<i>DS<sup>v</sup></i>	KG	<i>DS<sup>v</sup></i>	Pasto	<i>DS<sup>v</sup></i>
	Morado		Verde		Elefante	
<b>Materia Seca (%)</b>						
<b>Hoja</b>	13,08 <sup>c</sup>	0,54	14,46 <sup>b</sup>	0,53	15,46 <sup>a</sup>	0,29
<b>Tallo</b>	10,88 <sup>x</sup>	0,92	11,61 <sup>x</sup>	0,79	11,64 <sup>x</sup>	0,93
<b>Cenizas (%)</b>						
<b>Hoja</b>	16,15 <sup>a</sup>	0,47	15,87 <sup>a</sup>	0,72	16,50 <sup>a</sup>	1,52
<b>Tallo</b>	12,88 <sup>x</sup>	0,71	13,73 <sup>x</sup>	0,97	14,98 <sup>x</sup>	0,72
<b>Fibra Detergente Neutro (%)</b>						
<b>Hoja</b>	62,79 <sup>c</sup>	1,51	73,22 <sup>a</sup>	0,94	71,07 <sup>b</sup>	0,72
<b>Tallo</b>	69,31 <sup>y</sup>	1,05	77,41 <sup>x</sup>	1,46	77,37 <sup>x</sup>	1,71
<b>Fibra Detergente Ácido (%)</b>						
<b>Hoja</b>	37,75 <sup>c</sup>	1,61	43,68 <sup>a</sup>	1,19	41,21 <sup>b</sup>	1,15
<b>Tallo</b>	44,46 <sup>z</sup>	1,42	51,48 <sup>x</sup>	0,91	47,03 <sup>y</sup>	2,01
<b>Hemicelulosa (%)</b>						
<b>Hoja</b>	25,04 <sup>b</sup>	2,17	29,55 <sup>a</sup>	1,56	29,86 <sup>a</sup>	3,07
<b>Tallo</b>	24,85 <sup>y</sup>	2,37	25,93 <sup>y</sup>	1,15	30,33 <sup>x</sup>	1,56
<b>Celulosa (%)</b>						
<b>Hoja</b>	27,98 <sup>b</sup>	1,18	31,22 <sup>a</sup>	1,00	29,85 <sup>a</sup>	1,74
<b>Tallo</b>	34,99 <sup>y</sup>	1,98	38,31 <sup>x</sup>	1,41	37,84 <sup>x</sup>	1,00
<b>Lignina (%)</b>						
<b>Hoja</b>	8,27 <sup>a</sup>	1,87	9,13 <sup>a</sup>	0,65	8,43 <sup>a</sup>	1,24
<b>Tallo</b>	10,41 <sup>y</sup>	0,49	11,98 <sup>x</sup>	1,31	10,62 <sup>x</sup>	0,65

Valores con letras diferentes en la misma fila presentan diferencias significativas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

*DS<sup>k</sup>*: Desviación Estándar

### 3.3. TRATAMIENTO ALCALINO DE CELULOSA

En la Tabla 9 se muestra, el contenido de cenizas correspondiente a las altas adiciones de EDTA (experimentos 3, 6, 9 y 12) son constantemente inferiores a los correspondientes a las adiciones de EDTA bajas (experimentos 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11).

Tabla 9. Datos Preliminares Experimentales NaOH-EDTA.

N <sup>o</sup>	Condiciones de los Tratamientos				Variables Respuesta		
	NaOH (%) <sup>a</sup>	EDTA (%) <sup>b</sup>	Tiempo (min)	Tem (°C)	R (%) <sup>c</sup>	$\alpha$ Celulosa (%)	Cenizas (%)
1	10	5	120	80-90	33,64	78,08	3,11
2	10	7,5	120	80-90	35,35	75,95	2,69
3	10	10	120	80-90	39,40	74,40	2,23
4	20	5	120	80-90	31,83	81,55	3,10
5	20	7,5	120	80-90	34,39	80,30	2,67
6	20	10	120	80-90	38,04	79,25	2,00
7	25	5	120	80-90	29,78	81,77	2,75
8	25	7,5	120	80-90	31,91	81,10	2,19
9	25	10	120	80-90	34,91	80,15	2,20
10	30	5	120	80-90	27,06	78,49	2,14
11	30	7,5	120	80-90	28,76	78,33	1,30
12	30	10	120	80-90	29,56	77,03	0,95

<sup>a</sup> Concentraciones de NaOH. p/v %.

<sup>b</sup> Concentraciones de EDTA. p/v %.

<sup>c</sup> Rendimiento de celulosa . p/v%.

Puede observarse a partir de los datos incluidos en la misma Tabla 9, la presencia de EDTA en los licores de cocción también ha contribuido a un ligero aumento en el rendimiento de celulosa. El ajuste de los modelos se estimó mediante el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>). Como puede verse, los tres valores para R<sup>2</sup> son bastante altos. El valor más bajo de los tres (0,708) corresponde al caso del contenido de  $\alpha$  celulosa y el más alto (0,910) al rendimiento de celulosa. Siempre un valor más alto para R<sup>2</sup> indica un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales.

Los valores de R<sup>2</sup> indican que los modelos ajustados representaron aproximadamente el 76% de las variaciones totales en los datos

experimentales, lo que muestra una alta significación. Los valores de los coeficientes de determinación ajustados para  $Y_r$  (0,910) es el más alto, seguido de  $Y_c$  (0,785) y finalmente con  $Y_\alpha$  (0,708) respectivamente, son también lo suficientemente altos como para sostener la alta significación de los modelos. Las Ecuaciones 9, 10 y 11 son obtenidas del análisis de regresión señalados en metodología.

Ecuación 9. Rendimiento de Celulosa obtenido.

$$Y_r = 23,82 + 0,77 * X_h + 0,74 * X_e - 0,023 * X_h^2 - 0,029 * X_h * X_e + 0,059 * X_e^2 \quad (9)$$

$$p < 0.05; R^2 = 0,910$$

Ecuación 10. Alfa - Celulosa obtenida.

$$Y_\alpha = 70,39 + 1,41 * X_h - 0,757 * X_e - 0,037 * X_h^2 + 0,023 * X_h * X_e - 0,013 * X_e^2 \quad (10)$$

$$p < 0.05; R^2 = 0,708$$

Ecuación 11. Contenido de Cenizas obtenido.

$$Y_c = 3,62 + 0,20 * X_h - 0,46 * X_e - 0,0062 * X_h^2 - 0,0014 * X_h * X_e + 0,02 * X_e^2 \quad (11)$$

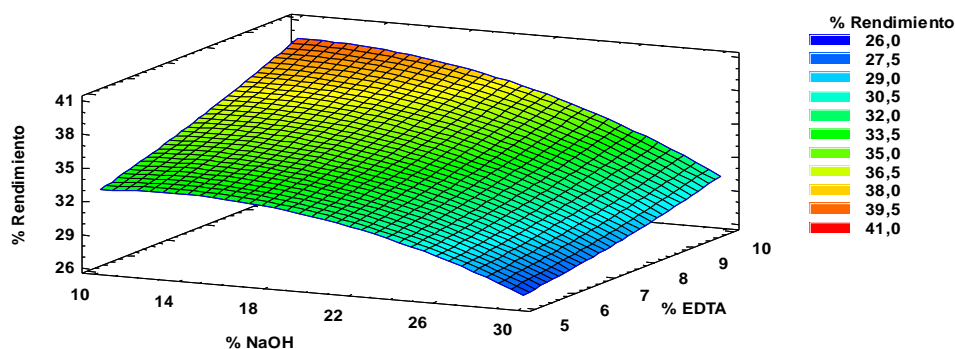
$$p < 0.05; R^2 = 0,785$$

### 3.4.OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ALCALINAS POR MSR

Las gráficas de superficie de respuesta tridimensional (3D) se dibujaron para ilustrar los efectos de las variables independientes sobre las variables dependientes. Los efectos de la concentración de hidróxido de sodio y de EDTA sobre el rendimiento de celulosa, contenido de  $\alpha$  celulosa y el contenido de cenizas del producto de celulosa se muestran por los coeficientes de las ecuaciones polinómicas Ec. (9) y Ec. (10), y Ec. (11) respectivamente.

Las superficies de respuesta derivada de la Ec. (9) se muestra en el Gráfico 4, donde se muestra el efecto de la concentración de NaOH y EDTA sobre el rendimiento de celulosa. Se puede observar un efecto cuadrático con NaOH, o más bien un efecto casi lineal sobre el rendimiento de celulosa.

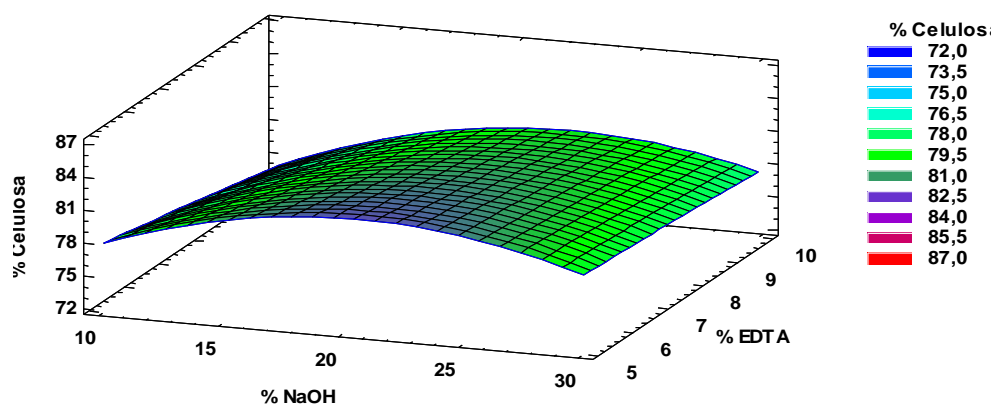
Gráfico 4. Rendimiento Celulosa



Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

Se puede apreciar en la gráfica 4, que la adición de EDTA manifiesta un papel protector que desempeña este agente quelante sobre la celulosa, en que el rendimiento aumenta, y no disminuye, con la adición de este agente. El hecho de que estos aumentos sean relativamente pequeños pero significativos, indica que el efecto es digno de ser tomado en cuenta. Se puede observar un efecto cuadrático con relación a % NaOH y un efecto casi lineal en % EDTA sobre la respuesta. En conjunto, los aumentos de ambas concentraciones dieron como resultado una disminución continua esperada en el rendimiento de celulosa.

Gráfico 5. Contenido de Alfa-celulosa.

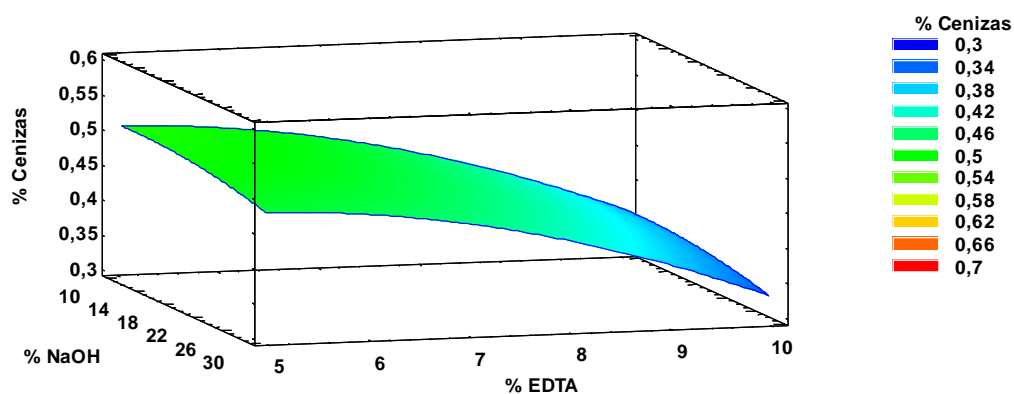


Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

Por alfa-celulosa se entiende aquella parte de materiales celulósicos que es insoluble en una solución de hidróxido de sodio. Cross y Bevan mencionaron por primera vez el uso analítico de la mercerización cáustica para el aislamiento de la "celulosa normal".

La Gráfica 5, corresponde la superficie de respuesta de la Ec. (10), donde se representa el mayor contenido de  $\alpha$ -celulosa en las variables independientes (% NaOH - %EDTA). En la misma se observa un crecimiento ascendente del contenido de  $\alpha$ -celulosa en relación con la cantidad de Hidróxido de Sodio, es decir el contenido de celulosa depende del % NaOH que se emplee. En cambio con el % EDTA se mantiene de forma constante y no influye en el contenido de celulosa.

Gráfico 6. MSR - Cantidad de Cenizas en Celulosa.



Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

En la Gráfica 6 se observa el contenido de cenizas analizado en la celulosa Ec. (11), muestra una actividad descendente en relación con el % EDTA, ya que existe una disminución lineal al aumentar la cantidad del agente quelante. En el caso de las concentraciones de Hidróxido de Sodio, la actividad de cenizas permanece constante. El examen de esta superficie de respuesta muestra que el contenido de cenizas del producto de celulosa disminuye fuertemente con el aumento de la adición de EDTA. El papel del agente quelante es eficaz, ejercido por EDTA pero hay que mencionar en particular que este efecto no hubiera sido posible sin la acción estabilizadora del NaOH .



### 3.5. APLICACIÓN DE CONDICIONES DE CELULOSA EN LOS FORRAJES

Una vez que se conocen las condiciones óptimas para la obtención de celulosa se analiza los forrajes estudiados para conocer el mayor rendimiento con las variables independientes antes analizadas. Se presenta en la Tabla 10, el rendimiento de los tres forrajes.

Tabla 10. Rendimiento de KG Verde, KG Morado y Pasto Elefante.

Componente	King Morado	Grass DS	King Verde	Grass DS	Pasto Elefante	DS
<b>Porcentaje de Rendimiento</b>						
Hoja	30,91 <sup>b</sup>	0,80	34,91 <sup>a</sup>	0,94	33,21 <sup>a</sup>	0,92
Tallo	40,96 <sup>b</sup>	1,06	51,16 <sup>a</sup>	1,33	50,02 <sup>a</sup>	1,30

Valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

DS: Desviación Estándar.

Se observa un aumento en el rendimiento de celulosa comparado con la Tabla 4 que señala la cantidad de celulosa que posee cada fracción del forraje. En la Tabla 10 se muestran los porcentajes de rendimientos de King Grass Verde con el mayor rendimiento en hojas (34,91%) y en tallos (51,16%), seguido del Pasto Elefante y King Grass Morado con el menor contenido. Los tallos son los que mayor rendimiento poseen ( $40,96 \pm 1,06$  a  $51,16 \pm 1,33$ ), como se señala en la caracterización, seguido de las hojas entre ( $30,91 \pm 0,80$  a  $34,91 \pm 0,94$ ).

### 3.6. CARBOXIMETIL CELULOSA (CMC)

La síntesis de CMC se llevó a cabo mediante dos reacciones: alcalinización y eterificación. La metodología de superficie de respuesta (MSR) se utilizó para analizar la condición óptima para la síntesis de CMC. El experimento de diseño consiste en 2 factores (NaOH, MCA) en el que 3 niveles de cada uno que se los presenta en la Tabla 11, con un total de 9 experimentos. Los datos se procesaron con la función de análisis de datos en el programa Statgraphics. Los factores y niveles del parámetro de proceso, con las variables respuestas se presentan en la Tabla 11 .

Tabla 11. Datos Preliminares experimentales en Hidróxido de Sodio (%)-Ácido Monocloracético MCA (g).

VARIABLES INDEPENDIENTES			VARIABLES RESPUESTA			
Tratamiento	% NaOH	Peso de MCA (g)	(g/g) Rendimiento	GS	GP	
1	40	1	1,4238	0,622	85,40	
2	40	2	1,4891	0,617	88,74	
3	40	3	1,4959	0,622	86,93	
4	50	1	1,7015	0,715	91,84	
5	50	2	1,8946	0,765	95,39	
6	50	3	1,7984	0,706	93,03	
7	60	1	2,0227	0,509	87,27	
8	60	2	2,0498	0,510	82,32	
9	60	3	2,0199	0,510	86,38	

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

En la Tabla 11, se observan los resultados obtenidos del grado de sustitución para las diferentes condiciones experimentales. El GS es máximo para los tratamientos 4,5,6, los cuales corresponden a una concentración de NaOH del 50% , el mayor grado de pureza coincide con los mismo tratamientos. Estos datos son comparables con las gráficas 8 y 11 de superficie de respuesta.

Se investigó el efecto de la concentración de hidróxido de sodio (Zh) y de MCA (Zc), sobre el rendimiento de Carboximetil celulosa (Ym). Se estudiaron los efectos mediante análisis de varianza y gráficos de superficie-respuesta, a fin de obtener óptimas condiciones para CMC. Las ecuación (12) que pertenece a Ym o rendimiento de CMC, (13) con la nomenclatura Ys que corresponde al grado de sustitución y (14) con Yp con el grado de pureza:

Ecuación 12. Rendimiento de Carboximetil Celulosa obtenido.

$$Y_m = -1,27 + 0,08 * Z_h + 0,39 * Z_c - 0,0005 * Z_h^2 - 0,002 * Z_h * Z_c - 0,067 * Z_c^2 \quad (12)$$

$$p < 0.05; R^2 = 0,905$$

Ecuación 13. Grado de Sustitución de CMC.

$$Y_s = -3,14243 + 0,158286 * Zh + 0,0649443 * Zc - 0,00163879 * Zh^2 + 0,000030505 * Zh * Zc - 0,0169286 * Zc^2 \quad (13)$$

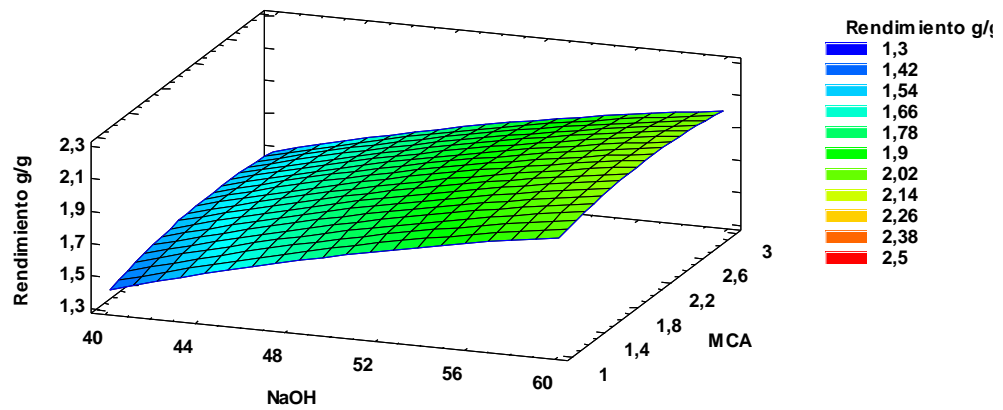
$$p < 0.05; R^2 = 0,91$$

Ecuación 14. Grado de Pureza de CMC.

$$Y_p = -73,8003 + 6,86886 * Zh - 2,18457 * Zc - 0,0724732 * Zh^2 + 0,146723 * Zh * Zc - 1,14467 * Zc^2 \quad (14)$$

$$p < 0.05; R^2 = 0,59$$

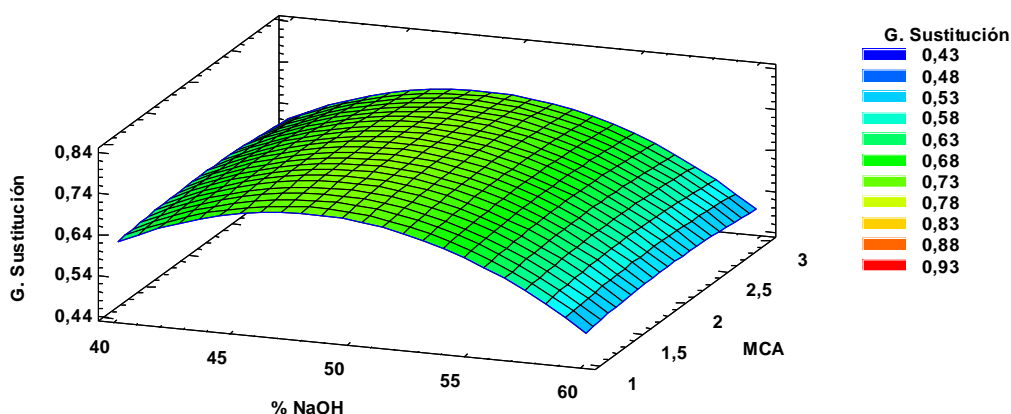
Gráfico 7. MSR - Rendimiento de CMC.



Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion

Se puede observar en la Gráfica 7 que corresponde a la ecuación 12 que se obtiene mayor rendimiento al aumentar las concentraciones de NaOH y el comportamiento en relación a las cantidades de Ácido Monocloracético permanece constante.

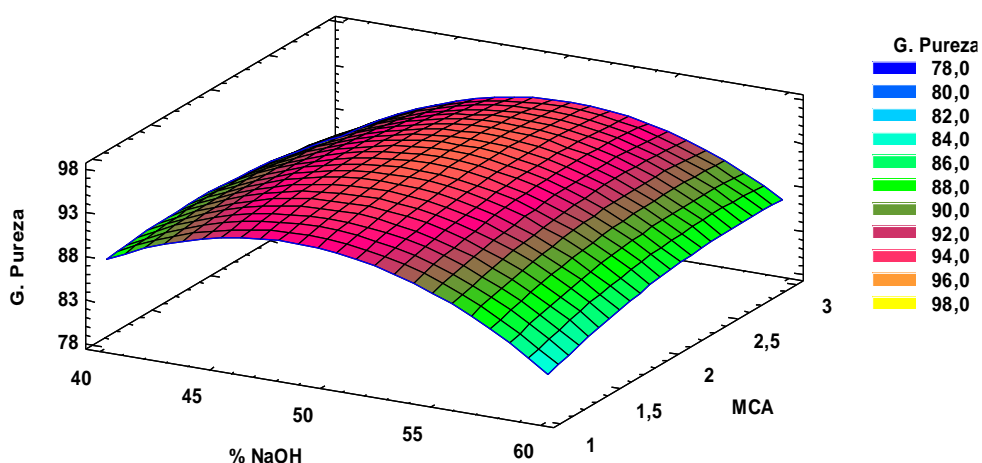
Gráfico 8. MSR- Grado de Sustitución.



Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion

En el Gráfico 8 se observa el comportamiento del Grado de Sustitución según la ecuación 13, donde el mayor grado de sustitución se encuentra al 50 % y el MCA se comporta de forma lineal.

Gráfico 9. MSR- Grado de Pureza.



Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion

En la Gráfica 9 que corresponde a la ecuación 14, se obtiene un máximo de pureza trabajando a 50 % de concentración de hidróxido de sodio mientras con la concentración de MCA, se observa un efecto lineal, negativo.

## CAPÍTULO IV

### 4. DISCUSIÓN

#### 4.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE FORRAJES

En la Tabla 8 se observan los contenidos de materia seca de la hoja y el tallo de los forrajes poseen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los resultados mostraron que el contenido de MS fue el máximo en fracción foliar, variando de  $13,08 \pm 0,54$  a  $15,46 \pm 0,29\%$ , seguido por la materia seca mínima donde se registró en la fracción de tallos ( $10,88 \pm 0,92$  a  $11,64 \pm 0,93\%$ ), además se observó que los cambios en el contenido de materia seca en los tres tipos de forrajes no presentaron diferencias significativas en tallos. (Chacón, P; Vargas, 2009) informaron que la materia seca aumenta en relación con la edad y existe mayor cantidad en hojas que en tallos debido al aumento de la actividad fotosintética de la planta lo que llevó a una mayor producción de biomasa en las hojas, donde a la edad de 75 días reportaron en hojas  $16,66\%$  y en tallos  $12,05\%$ , datos que resultan ser similares al trabajo estudiado.

En Fibra Detergente Neutro (FDN): Se observó una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el contenido de FDN de tallos, hojas y los tres tipos de forrajes estudiados. La concentración de FDN ( $77,41 \pm 1,46$  a  $69,31 \pm 1,05\%$ ) fue mayor en tallo que en la hoja ( $73,22 \pm 0,94$ ) a ( $62,79 \pm 1,51\%$ ), mientras que se registraron valores más bajos en KG Morado. Las fracciones de hojas y tallos de los forrajes mostraron efectos significativos sobre el contenido de FDN, como también en el tipo de forraje. Se observaron contenidos significativamente más bajos de FDN en King Grass Morado, y un mayor contenido en King Grass Verde y Pasto Elefante. Chacón y Vargas (2009) reportaron una tendencia creciente de FDN en King Grass y encontró que la composición nutricional a los 75 días en hojas era de  $74,30\%$  y en tallos de  $80,86\%$  y con diferencias significativas en estas fracciones.

Fibra Detergente Ácido (FDA): Se observaron cambios significativos en FDA en hojas y tallos de los diferentes tipos de forrajes estudiados. Se observó que el contenido de FDA del tallo oscilaba entre  $44,46 \pm 1,42$  y  $51,48 \pm 0,91\%$ , siendo mayor que el de las hojas ( $37,75 \pm 1,61$  a  $43,68 \pm 1,19$ ). Chacón y Vargas (2009) informaron que los constituyentes de la pared celular y FD A aumentaron de manera lineal con maduración. FDA aumentó en el King Grass en tres edades de rebrote estudiados (60-75 y 90 días). Como consecuencia del avance de la madurez, los cambios en FDA fueron menos marcados en las hojas que los tallos. Debido al aumento en la proporción de tallos con respecto a la cantidad de hojas que se observa cuando avanza la madurez. Los resultados de los trabajos informados anteriormente apoyan los hallazgos del presente estudio.

En la cantidad de hemicelulosa se observó un aumento significativo en el contenido de hemicelulosa en hojas y tallos, como también en los tipos de forrajes. La concentración de hemicelulosa fue mayor ( $25,04 \pm 2,17$  a  $29,86 \pm 3,07$ ) en la fracción foliar, que en los tallos ( $24,85 \pm 2,37$  a  $30,33 \pm 1,56\%$ ); Mientras que el mayor contenido de hemicelulosa se presentó en el pasto elefante, y el contenido más bajo el King Grass Verde. (Cardona et al, 2013) informó que el valor de la hemicelulosa para el King Grass fue de 23,6 % y Pasto Elefante de 22,6 % . Sin embargo, los valores reportados por ellos son ligeramente menores que los registrados en el presente estudio. Además estudió el pretratamiento alcalino de Pasto Elefante y King Grass para la producción de Bioetanol, reportó que la hemicelulosa es uno de los principales constituyentes de la pared celular siendo un componente importante de las hojas.

Los resultados en celulosa mostraron que los contenidos de celulosa de los forrajes y sus fracciones de hojas y tallos fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Se registró que los contenidos de celulosa de la fracción de tallos fueron mayores ( $34,99 \pm 1,98$  a  $38,31 \pm 1,41\%$ ) y fueron mínimos ( $27,98 \pm 1,18$ ) a  $31,22 \pm 1,00\%$ ) en la fracción foliar. El tallo y hoja de King Grass Morado presenta un contenido significativamente menor de celulosa que el Pasto Elefante y King Grass Verde. informaron que el valor promedio de la celulosa fue del 30,72% King Grass y (Chacón, P; Vargas 2009) 36,76

% en hojas y 38,51% en tallos, lo que difirió significativamente entre las partes de la planta. Los resultados antes mencionados son estrechamente comparables con los obtenidos en el presente estudio donde se establecieron que la celulosa acumulada se encuentra principalmente en el tallo.

Los datos de lignina revelaron que los contenidos de lignina de las fracciones del tallo oscilaron entre  $10,41 \pm 0,49$  y  $11,98 \pm 1,31\%$ , mientras que la fracción foliar de la planta tuvo la menor lignina ( $8,27 \pm 1,87$  a  $9,13 \pm 0,65\%$ ). La lignina resulta ser un componente que proporciona dureza por lo tanto existe mayor cantidad de esta variable en los tallos, siendo King Grass Verde el que mayor cantidad posee y King Grass Morado la mínima en los tres forrajes estudiados. Chacón y Vargas (2009) informaron que en promedio el contenido de lignina en hojas fue de 9,75% y en tallos de 16,13 % en King Grass. Sin embargo, los valores reportados por estos trabajadores fueron mayores que los observados en el presente estudio. La proporción de hojas presentes en la planta determina también los porcentajes de MS, cenizas, FAD, celulosa y lignina, ya que estos aumentan su concentración en la planta al incrementarse la cantidad de hoja; mientras que la cantidad de FND se disminuye. Debido a la edad de los forrajes (75 días) el proceso de lignificación aún no es marcado.

Los contenidos de cenizas de los tres tipos de forrajes y sus fracciones de hojas y tallos revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Donde las fracción foliar son las que mayor cantidad presentan entre  $15,87 \pm 0,72$  a  $16,50 \pm 1,52$  y los contenidos de cenizas de las fracciones de tallos corresponden a  $12,88 \pm 0,71$  a  $14,98 \pm 0,72$ . (Herrera et al, 2013) reportan que la media de cantidad de cenizas en hojas es de 17,5% y en tallos de 16,9 % en King Grass, estos datos resultan ser superiores a los obtenidos en este estudio pero sin grandes diferencias.

La composición de estos forrajes fue similar a la reportada por (Cardona et al, 2013) quienes reportaron valores de 23,6 - 21,9 - 15,4 - 14,6 % en Celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas, correspondientes a King Grass y en el caso del Pasto Elefante con valores de 22,6 - 20,9- 19,4- 11,1 en los mismos análisis señalados.

Todas estas propiedades convierten estos forrajes en una valiosa fuente de celulosa que, desafortunadamente, todavía no ha sido totalmente explotada para la preparación de productos de celulosa de alta pureza. Otra observación se refiere al alto contenido de cenizas que poseen los forrajes entre 13,73 – 16,75%, que resulta ser problemática en la elaboración de productos con celulosa según (Tasaso, 2015).

### 3.7.OPTIMIZACIÓN DE CELULOSA

Tabla 12. Óptimas Condiciones y Resultados de Celulosa.

<b>Condiciones</b>	<b>Óptimas Condiciones</b>	<b>Resultados Calculados</b>	<b>Resultados Experimentales</b>
<b>NaOH (p/v.%)</b>	25	-	-
<b>EDTA (p/v. %)</b>	10	-	-
<b>Tiempo (min)</b>	120	-	-
<b>Temperatura (°C)</b>	80-90	-	-
<b>Rendimiento (%)</b>	-	34,74	34,91
<b><math>\alpha</math>-celulosa (%)</b>	-	79,4	80,15
<b>Cenizas (%)</b>	-	1,80	2,20

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

El destino final de la celulosa obtenida es la transformación a Carboximetil celulosa, buscando mayor cantidad de  $\alpha$ -celulosa, como también el menor contenido de cenizas para que estas no interfieran en la elaboración de CMC. En la Tabla 12 se presenta las condiciones óptimas para maximizar el contenido de  $\alpha$ -celulosa, junto con los resultados calculados con la ecuación 10 y los resultados experimentales.

Para el contenido de  $\alpha$ -celulosa Ec. (10) generó un efecto de 80,15%, aplicando el óptimo de concentración de Hidróxido de Sodio y finalmente en el contenido de cenizas se obtuvo 2,20%, aplicando el porcentaje de EDTA con sus altos contenidos de concentración para el proceso de pulpa óptimo.

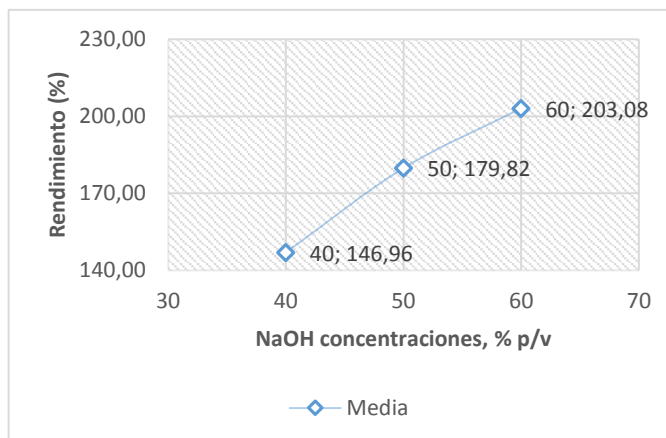
### 3.8.RENDIMIENTO DE CARBOXIMETIL CELULOSA

El rendimiento porcentual de los forrajes carboximetilizado sintetizado con diversas concentraciones de NaOH, se muestran en las gráficas 9 y 10. El rendimiento porcentual de celulosa aumentó con concentraciones crecientes de NaOH debido a la transformación de los



grupos hidroxilo de la molécula de celulosa en una forma de alcóxido, por lo tanto, el aumento en rendimiento porcentual es atribuible a la presencia de grupo carboximetilo con su masa más alta.(Lawal, Lechner, and Kulicke, 2008).

Gráfico 10. Rendimiento de CMC por Dispersión.



Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion

Al optimizar la respuesta del modelo empleado, se busca maximizar el porcentaje de rendimiento, con un valor óptimo de 2,03 g/g, bajo condiciones de hidróxido de Sodio de 60%, estos datos son comparables con los realizados por (Rachtanapun et al. 2012) y Ácido cloracético de 3 gramos, que es la cantidad máxima estudiada con una cantidad de celulosa de 2 gramos. Sin embargo al realizar un ANOVA sobre el comportamiento de cantidad de MCA  $p > 0.05$ , se rechaza la hipótesis que el rendimiento de CMC depende del contenido de MCA, estos datos concuerdan en el estudio (Iberahim et al, 2013) donde muestra que la cantidad del ácido Monocloracético no influye en el rendimiento de CMC.

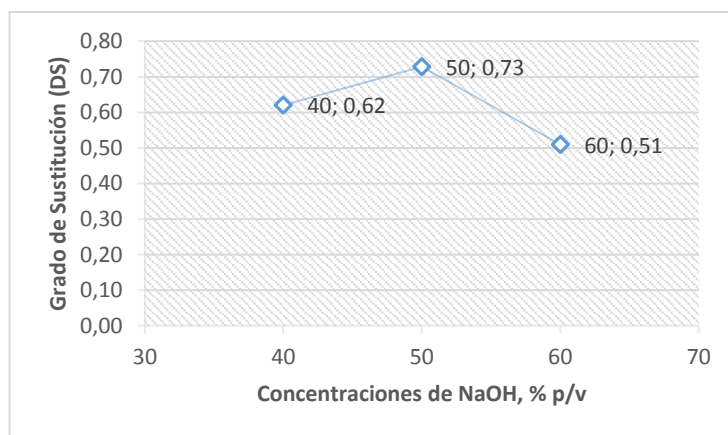
### 3.9.GRADO DE SUSTITUCIÓN (GS)

Se estudiaron los efectos de NaOH y MCA mediante análisis de varianza, donde para el caso de concentración de Hidróxido de Sodio, el valor de P es igual a 0,001 y es menor al valor del nivel de significancia de 0.05, por lo tanto se concluye que la concentración de NaOH influye en el Grado

de Sustitución. Sin embargo en el caso de MCA el P fue de 0,28 por lo tanto el contenido de Ácido Cloracético no interviene en el grado de sustitución.

Existe una relación entre el uso de diversas concentraciones de NaOH y valores de GS en CMC se muestra en Gráfico 11. Los valores de forrajes carboximetilizado obtenido fueron de 0,51 - 0,73. Se han estudiado muchas investigaciones sobre la modificación de celulosa mediante carboximetilación de un solo paso como: (Gamboni et al. 2010) reportaron resultados similares en Bagazo de Caña de Azúcar carboximetilo (0,54-0,79) donde encontraron que el valor GS de CMC incrementa con el aumento de concentración NaOH, cuando la relación molar de ácido cloroacético era constante. Además (León et al. 2013) concluyeron que el GS reemplaza de los tres grupos hidroxilos de la unidad de glucosa por carboxilos, estudio realizado en bagazo de caña de azúcar con un GS ( $0,75 \pm 0,10$ ).

Gráfico 11. Gráfico de Sustitución (GS) - Dispersión.



Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion

En este estudio, una concentración creciente de NaOH dio como resultado un aumento de GS que alcanzó un valor óptimo a 50% de concentración de NaOH. Esto se debe a que la región cristalina en la celulosa se vuelve más amorfa con el aumento de la concentración de NaOH y, por lo tanto, se produce una sustitución mejorada. Sin embargo, cuando la concentración de NaOH era del 60%, el grado de sustitución del CMC disminuyó, debido a la degradación de las cadenas de celulosa por la hidrólisis alcalina. Los aumentos en la concentración de NaOH también aumentaron la formación de anhidro glucopiranososa.(Hong,2013).

Se realizó Grado de Sustitución y Grado de pureza en las diferentes concentraciones de hidróxido de Sodio estudiadas, donde se busca obtener parámetros óptimos de CMC.

En la Tabla 13 se presentan las condiciones óptimas junto con los resultados calculados por la ecuaciones y los resultados experimentales. En esta comparación se observan ligeras diferencias donde el resultado experimental fue mayor que el resultado calculado.

Tabla 13. Condiciones y Resultados Óptimos para la Obtención de CMC.

<b>Condiciones</b>	<b>Óptimas Condiciones</b>	<b>Resultados Calculados</b>	<b>Resultados Experimentales</b>
<b>NaOH (p/v.%)</b>	50	-	-
<b>MCA (g)</b>	2	-	-
<b>Tiempo (min)</b>	180	-	-
<b>Temperatura (°C)</b>	70	-	-
<b>Rendimiento (g/g)</b>	-	1,79	1,89
<b>Grado de Sustitución</b>	-	0,74	0,77
<b>Grado de Pureza</b>	-	94	95,39

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

### **3.10. APLICACIÓN DE CONDICIONES DE CMC EN LOS FORRAJES**

Como se puede apreciar en la tabla 14, las hojas son las que mayor contenido de grado de sustitución tienen, debido a que en el tallo podrían existir residuos del material lignocelulósicos lo que no permite la utilización completa de celulosa en el tallo, por lo tanto interfiere en la eterificación del proceso de obtención de CMC. Además se compara con la Norma de CMC donde el único parámetro que no cumple es el de pureza, sin embargo para solucionar el grado de pureza se realiza más lavados con etanol.

Tabla 14. Calidad de CMC de King Grass Verde, Morado y Pasto Elefante.

Componente	King Grass	King	Pasto	Norma (ASTM
	Morado	Grass Verde	Elefante	D1439 - 03 2004)
Grado de Sustitución				
Hoja	0,784	0,77	0,309	0,6 – 1,0
Tallo	0,550	0,588	0,211	
Grado de Pureza				
Hoja	96%	95,39%	87 %	>98%
Tallo	89%	86%	85%	
Rendimiento g/g				
Hoja	1,80	1,89	1,36	-
Tallo	1,39	1,41	1,24	
pH (20°C)				
Hoja	6,71	6,75	6,74	6,8 - 8,0
Tallo	6,5	6,47	6,4	

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion

### 3.11. APLICACIÓN DE CMC EN JUGO - VISCOSIDAD

Para evaluar la capacidad del espesante obtenido se realizó el análisis de viscosidad de los tres forrajes comparando con el Carboximetil celulosa comercial, con el fin de identificar el tipo de CMC obtenido.

Tabla 15. Datos de Viscosidad de CMC

DATOS EXPERIMENTAL	
Carboximetil Celulosa 2%	mPas
Blanco	4,6
Comercial	8,447
King Grass Verde	40,73
King Grass Morado	43,40
Paste Elefante	38,73

Elaborado por: Antonieta Cazco ..

En la Tabla 15 se presentan los valores de viscosidad en mPas del CMC obtenido de las hojas en los tres forrajes. Las hojas de los forrajes carboximetilizados se encuentran en la categoría baja de viscosidad en el rango entre 25-50 mPas (Aqualon, 1999). Los residuos de NaOH que no se hayan eliminado con los lavados de ácido acético y etanol, disminuyen la viscosidad.(Bono et al. 2009) realizaron estudios de viscosidad en soluciones de carboximetil celulosa al 2% en pastel de Kernel de palma con 66,6. Donde 1mPas equivale a 1 cP.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

Los datos de caracterización fisicoquímica indicaron buenos niveles de celulosa y hemicelulosa, lo que sugiere su utilización como precursores para generar celulosa.

El King Grass Verde y Pasto Elefante poseen cantidades de celulosa significativamente iguales tanto en Tallos como en hojas, mientras que el King Grass Morado posee concentraciones inferiores a los dos forrajes indicados anteriormente.

El método de reflujo utilizado en esta investigación resultó ser apropiado únicamente para las hojas de los forrajes debido al contenido de material lignocelulósico que posee el tallo.

Las condiciones óptimas para obtener 34,91 % de celulosa con un contenido de 80,15 % de  $\alpha$ - celulosa y con la menor cantidad de cenizas (2,20%) a partir de las hojas de King Grass Verde como materia prima son: solución de NaOH al 25%, EDTA al 10%, 120 minutos de cocción a una temperatura entre 80 y 90°C,

Las condiciones óptimas para la obtención de carboximetil celulosa a partir de 2 gramos celulosa de KGV son: 2 ml de NaOH al 50%, 2 gramos de MCA, 180 minutos a una temperatura de 70°C, lo que permitió obtener un grado de sustitución de 0,77 y un grado de pureza del 95,39 % , y un rendimiento en función de la celulosa de 1,89 g/g.

A concentraciones mayores del 50% de solución de Hidróxido de Sodio para la elaboración de Carboximetil Celulosa aumentan el rendimiento

de CMC, sin embargo el grado de sustitución y el grado de pureza disminuyen.

El Carboximetil Celulosa obtenido posee una viscosidad de 38-43 mPas y se considera como un espesante de baja viscosidad, donde el CMC de hojas de King Grass Morado fue el que mayor viscosidad presentó, comparando con King Grass Verde y Pasto Elefante, afirmando que existe una correlación entre el Grado de sustitución, pureza y viscosidad.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

Para utilizar los tallos en la elaboración de celulosa y carboximetilcelulosa se quiere del proceso Druvacell, que consiste en un reactor donde se consideraría la presión, que ayudaría a la eliminación del sílice que se encuentra en esta fracción de la planta y la cual no fue posible eliminarla con reflujo en este trabajo

Se recomienda realizar este estudio con concentraciones de hidróxido de sodio inferiores a 40% y superiores a 60% para conocer el grado de sustitución y pureza

Realizar estudios de caracterización por espectrofotometría infrarroja para comparar el grado de sustitución obtenido por gravimetría.

Realizar estudios con diferentes tiempos y temperaturas de cocción para obtener óptimas condiciones en celulosa y carboximetilcelulosa.

Realizar la investigación en otros tipos de plantas trabajando una a la vez para poder expresar efectos en las variables dependientes de forma específicas.

Hacer un estudio económico sobre la elaboración de Carboximetil Celulosa con reactivos Grado Industrial es decir que posean un menor contenido de pureza que los y utilizados en este estudio.

## **CAPÍTULO VI**

### **6. PROPUESTA**

#### **6.1.TÍTULO DE LA PROPUESTA**

Obtención de Carboximetil Celulosa a escala piloto a partir de Hojas de King Grass Morado (*Pennisetum Hybridum*).

#### **6.2.INTRODUCCIÓN**

Los forrajes o plantas anuales resultan ser destinados únicamente como alimento para el sector Agropecuario, sin embargo también posee potencial con destino a varios sectores debido a su composición química, en especial su materia lignocelulósica, donde la celulosa ocupa una posición estratégica en algunas industrias y se utiliza para obtener carboximetil celulosa o también conocido como CMC a partir de un recurso natural que abunda en el Ecuador como son los forrajes, puesto que después de la madera con un 45 % de celulosa, las gramíneas perennes son las que más celulosa poseen con una media de 25% – 30% y dentro de ellas el King Grass posee alrededor de un 32,6 % de celulosa, según informan Cardona, Ríos, y Peña (2012). La celulosa posee un amplio uso en la elaboración de comprimidos, aglutinantes, lubricantes, coadyudantes de recubrimientos para comprimidos, dispersantes en preparaciones líquidas, vehículo para colorantes y pigmentos, mejorador de fluidez en polvos y granulados, y de estabilidad de los principios activos en diversas formulaciones. . La celulosa puede sustituir al almidón, lactosa y otros azúcares en la preparación de alimentos, mejorando la compresibilidad de los ingredientes y haciendo posible su aplicación tanto en los métodos de fabricación por vía húmeda (granulación húmeda) o seca (compresión directa o granulación). Es por este motivo que se tratará de extraer y cuantificar el CMC en los forrajes Pasto Elefante y King Grass ya que son los que mayor cantidad de celulosa poseen.

### **6.3.OBJETIVOS**

#### **6.3.1. GENERAL**

Obtener Carboximetil Celulosa a escala piloto a partir de hojas de King Grass Morado (*Pennisetum Hybridum*).

#### **6.3.2. ESPECÍFICOS**

- a) Sintetizar por el método de reflujo la celulosa y carboximetilcelulosa a partir de King Grass morado, mediante el uso de hidróxido de sodio como agente de cocción.
- b) Establecer las condiciones ideales para optimizar el rendimiento de CMC, con mayor grado de sustitución, pureza y viscosidad.

### **6.4.FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO – TÉCNICA**

El uso de co-productos agroindustriales como fuente de nutrientes en dietas de animales se ha practicado durante décadas, ya que millones de toneladas de estos materiales se producen cada año. En la producción animal, los alimentos representan la mayor parte de los costos de producción, por lo que es indispensable utilizar eficientemente los recursos disponibles para maximizar el rendimiento animal.

El Pasto King Grass tiene como nombre científico *Pennisetum Hybridum* de la unión de *purpureum* x *P. typhoides*, que se ha utilizado en algunas de las explotaciones ganaderas Ecuatorianas, es una gramínea de corte, nativa de África del sur, crece desde el nivel del mar hasta los 2200 m.s.n.m, en zonas con temperaturas ambientales comprendidas entre los 18 y 30°C, es tolerante a la sequía y muestra gran capacidad de rebrote cuando se inician las lluvias. El uso principal de esta gramínea ha sido en corte, el cual se realiza entre 60 y 70 días, pues a mayor edad aumentan sus limitaciones nutricionales debido a la acumulación de lignina, sílice y sustancias pépticas. Se conoce que en este pasto se presenta alta concentración de hemicelulosa (7,8), 12% de proteína cruda y 62% de digestibilidad in vitro de la materia seca a los 60 días de rebrote. (Roncallo, A, and Castro 2012).

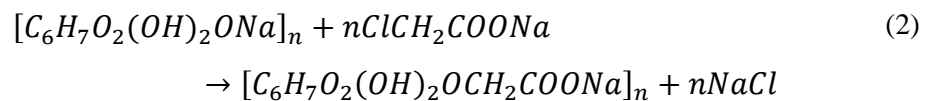
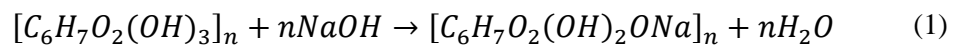
La celulosa es un polímero lineal simple que consiste en una unidad de anhidroglucopiranososa (AGU) unida entre sí con enlaces  $\beta$ - (1,4) -glucósidos



formados entre el carbono 1 y el carbono 4 de la glucosa adyacente. Cada una de las unidades de AGU consiste en tres grupos hidroxilo en las posiciones de carbono 2, 3 y 6. La celulosa está alineada paralelamente entre sí en fibrillas, que están rodeadas por la matriz de lignina y hemicelulosa. Además, la celulosa tiene propiedades tales como baja densidad, buenas propiedades mecánicas así como bio degradabilidad. Carboximetilcelulosa, CMC es un polisacárido aniónico, lineal, de cadena larga, soluble en agua, derivado de celulosa. (Tasaso, 2015).

La preparación de CMC implica dos etapas de reacción, que son proceso de alcalinización y eterificación. En el proceso de alcalinización, la celulosa se trata con NaOH, frecuentemente en presencia de un disolvente inerte (etanol o isopropanol), que actúa como agente hinchante y como diluyente que facilita una buena penetración en la estructura cristalina de la celulosa. Se solvate los grupos hidroxilo y por lo tanto los hace disponibles para la reacción de eterificación. (Tasaso, 2015).

El proceso de alcalinización se realiza generalmente a temperatura ambiente. En la etapa de eterificación, la celulosa alcalina se hace reaccionar con ácido monocloroacetato (NaMCA), o el ácido libre, ácido monocloroacético (MCA) para formar éteres de carboximetilcelulosa. Al mismo tiempo, el NaOH reacciona con MCA para formar dos subproductos, que son glicolato de sodio y cloruro de sodio. La reacción en el proceso de alcalinización, eterificación y reacción lateral es como se muestra en la ecuación (1), (2) y (3), respectivamente (Tasaso, 2015).



CMC es actualmente muchas aplicaciones en la industria como el aumento de la propiedad física del papel, como barro de perforación en la industria petrolera, como un espesamiento de tinte en la industria textil. En forma de

CMC purificado, se usó en las industrias de alimentos, farmacéuticos, detergentes y cosméticos.(Tasaso 2015).

En la presente investigación se realizó ensayos con cuatro diferentes concentraciones de NaOH y tres de EDTA para la obtención de celulosa y tres concentraciones de NaOH con 3 pesos de Ácido Cloracético para la elaboración de Carboximetil Celulosa donde las hojas de King Grass Morado fue el que mayor viscosidad se obtuvo de los tres forrajes estudiados. Donde su rendimiento fue de 1,8 g/g.

### **6.5.DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA**

Se justifica la investigación proponiendo un estudio donde se emplee concentraciones bajas, medias y altas en una única variable independiente (Hidróxido de Sodio), para observar el comportamiento de los factores de calidad que califican al Carboximetil Celulosa. Lo que proporcionará una mejor información en el momento que se forme el coloide.

### **6.6.METODOLOGÍA**

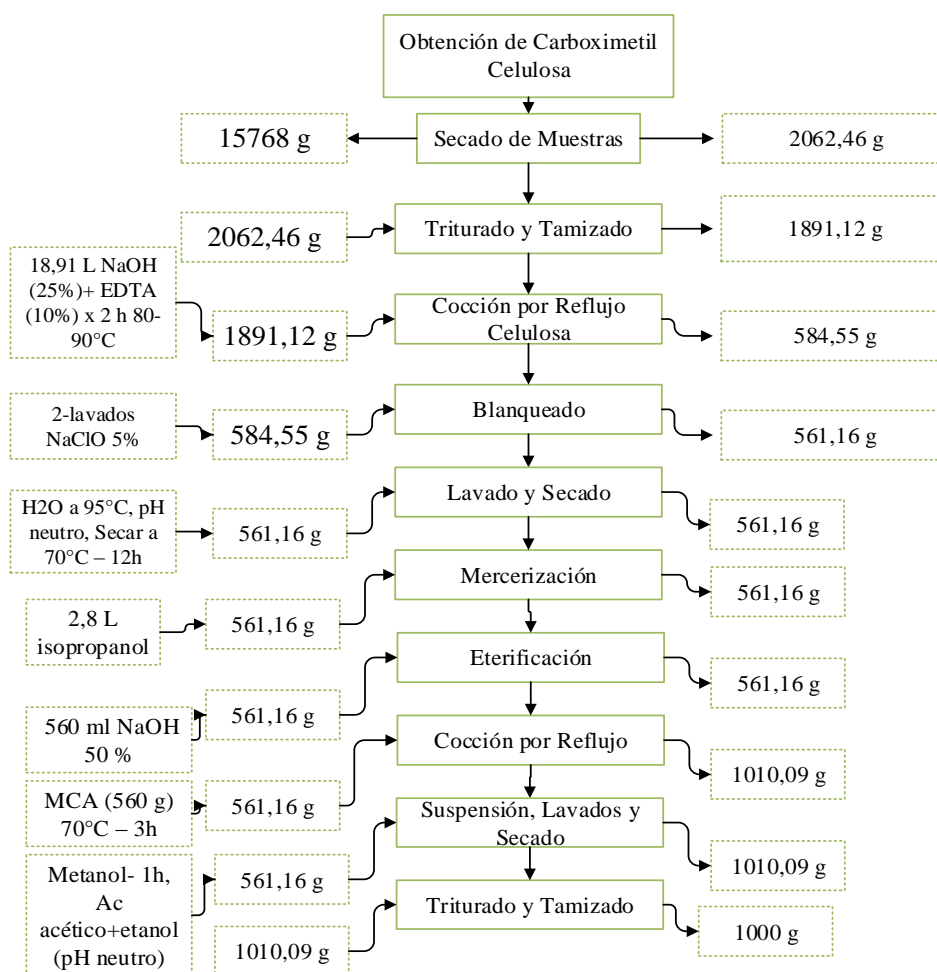
En el trabajo se utilizan procesos teóricos, experimentales y deductivos donde se establecen condiciones óptimas para un alto grado de sustitución, pureza y viscosidad.

### 6.6.1. OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE

TABLA DE OPERACIONES						
Variable	Tipo de Variable	Descripción	Dimensión	Indicadores	ITEMS	Instrumento / Método
Forrajes	Independiente	Pennisetum (Forrajes) son gramíneas perennes utilizadas en ganadería para la alimentación.	<i>Pennisetum Hybridum</i> (King Grass)	Madurez	75 días	Molino Balanza
Método de Extracción	Independiente	Métodos de Obtención de la Celulosa: Análisis de una muestra para identificar la concentración o propiedades de la misma.	Aislamiento de Celulosa	NaOH, EDTA	NaOH (25 %) EDTA (.10%)	Reflujo Estufa
Caracterización de CMC	Dependiente	Obtención de CMC	Blanqueamiento	NaClO	NaClO 5%	Medidor de pH, Balanza Analítica Reflujo
			Mercerización	Isopropanol	NaOH 50%.	
			Eterificación	NaOH y MCA		
			Complementos y Lavados	Metanol, Etanol y Ácido Acético Glacial		
			Rendimiento de CMC	Rendimiento	%	
Grado de Sustitución		-				
Grado de Pureza	Contenido	%	Gravimetría			
Viscosidad		mPas				

Elaborado por: Antonieta Cazco

## 6.6.2. PROCEDIMIENTOS



Elaborado por: Antonieta Cazco

## 6.7. CRONOGRAMA

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES PARA LA ELABORACIÓN DE CMC	
ACTIVIDADES	TIEMPO
Obtención de Materia Prima	Cultivo: 75 días
Recolección de Hojas	24 horas
Secado y Triturado	6 horas
AISLAMIENTO DE CELULOSA	
Cocción Alcalina	2 horas
Lavado, Filtrado,	2 horas
Blanqueado y Secado	12 horas
OBTENCIÓN DE CMC	
Mercerización	30 minutos
Eterificación	30 minutos
Reflujo	3 Horas
Lavados	2 horas
Secado y Triturado	6 Horas

Elaborado por: Antonieta Cazco

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aqualon. 1999. "Physical and Chemical Properties of Sodium Carboxymethylcellulose." *Hercules Incorporated*.
- AOAC-930.15 (1990) Moisture in animal feed. Drying . In: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th edn. AOAC, Arlington, Virginia, p. 69.
- "ASTM D1439 - 03." 2004. *Standard Test Methods for Sodium Carboxymethylcellulose*.  
<https://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/D1439-03.htm> (June 28, 2017).
- Barba, Claudia. 2002. "Síntesis de Carboximetilcelulosa (CMC) a Partir de Pastas de Plantas Anuales." <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=7699> (June 20, 2017).
- Bemhaja, María. 2000. "Bd 72. Pasto Elefante (Pennisetum Purpureum Schum.) INIA Lambaré."
- Bono, A et al. 2009. "ORIGINAL ARTICLE Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose from Palm Kernel Cake." *Advances in Natural and Applied Sciences* 3(2073): 5–11.
- Cardona, Eliana M., Jorge A. Rios, Juan D. Peña, and Luis A. Rios. 2013. "Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (Pennisetum Sp) Y King Grass (Pennisetum Hybridum) Cultivados En Colombia Para La Producción de Bioetanol." *Informacion Tecnologica* 24(5): 69–80.
- Cardona, Eliana M., Luis A. Rios, and Juan D. Peña. 2012. "Disponibilidad de Variedades de Pastos Y Forrajes Como Potenciales Materiales Lignocelulósicos Para La Producción de Bioetanol En Colombia." *Informacion Tecnologica* 23(6): 87–96.
- Castello, E et al. 2012. "Chemical Composition and Fermentation Characteristics of Elephant Grass Silage with Biodiesel Industry Co-Products." : 718–23.
- Castillo, Carlos. 2014. "Carlos Rafael Castillo Saldarriaga."
- Chacón, P;Vargas, C. 2009. "Nota Técnica Digestibilidad Y Calidad Del Pennisetum Purpureum Cv . King Grass a Tres Edades de Rebrote 1

Materiales Y Métodos.” 20(2): 399–408.

- Figueroa, Gudelia. 2003. “OPTIMIZACIÓN DE UNA SUPERFICIE DE RESPUESTA UTILIZANDO JMP IN Gudelia Figueroa Preciado Departamento de Matemáticas Universidad de Sonora.” *Universidad de Sonora* (11): 17–23.
- Finkeros.com. 2013. “King Grass - ABC Del Finkero.” <http://abc.finkeros.com/king-grass-pennisetum-purpureun/> (July 12, 2017).
- Gamboni, J, J Sánchez, A Slavutsky, and M Bertuzzi. 2010. “Celulosa Proveniente De Bagazo De Caña De Azúcar.”
- García, L, E Bordallo, D Ramírez, and D Cordero. 2013. “Obtención de Celulosa Microcristalina a Partir Del Bagazo de La Caña de Azúcar.” 47(6): 57–63.
- Guanha, M et al. 2014. “Obtención de Azúcares Fermentables a Partir de Pasto Elefante ( Pennisetum Purpureum ).” : 115–20.
- Hall, Morrison. 2000. “Characterization of Forages by Chemical Analysis.”
- Herrera, R S, F Zavala, E Olivares, and H Bernal. 2013. “Rendimiento Y Composición Química Del Pasto CT-115 ( Pennisetum Purpureum ) Establecido a Dos Densidades Y En Dos Fechas de Siembra En Marín , Nuevo León , México.” 115(tabla 1): 419–24.
- Hong, K O H M A Y. 2013. “PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF.” (May).
- Hubbe, Martin a., Orlando J. Rojas, Lucian a. Lucia, and Mohini Sain. 2008. “Cellulosic Nanocomposites: A Review.” *BioResources* 3(3): 929–80. [http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes\\_03\\_3\\_0929\\_Hubbe\\_RLS\\_Cellulosic\\_Nanocomposites\\_Rev](http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_03_3_0929_Hubbe_RLS_Cellulosic_Nanocomposites_Rev).
- Iberahim, Nur Izzati et al. 2013. “Sodium Hydroxide Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Oil Palm Mesocarp Fiber.” 4(3): 101–5.
- Jiménez, G et al. 2011. “Obtención De Carboximetil Celulosa Usando Lemna Como Materia Prima.” *Revista Iberoamericana de Polímeros* 12(6): 334–41. <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/DIC11/genire.pdf>.
- Latif, A, T Anwar, and S Noor. 2007. “Two Step Synthesis and Characterization of Carboxymethylcellulose from Rayon Grade Wood Pulp and Cotton Linter.” *Journal of Saudi Chemical Society* 10(1): 95–102.
- Lawal, O S, M D Lechner, and W M Kulicke. 2008. “International Journal of Biological Macromolecules Single and Multi-Step Carboxymethylation of Water Yam ( Dioscorea Alata ) Starch: Synthesis and Characterization.” 42: 429–35.

- León, V et al. 2013. “Obtención Y Caracterización de La Celulosa Hidrofóbicamente Modificada.”
- Mashego, Ditiro Victor. 2016. “Preparation , Isolation and Characterization of Nanocellulose From Sugarcane Bagasse.” (August).
- Mogollón, G, J García, and W León. 2012. “C APÍTULO I.” *Materias Primas Fibrosas*.
- Mundo Pecuario. 2015. “Pasto Elefante - Pennisetum Purpureum - Gramineas.” [http://mundopecuario.com/tema191/gramineas/pasto\\_elefante-1066.html](http://mundopecuario.com/tema191/gramineas/pasto_elefante-1066.html) (July 12, 2017).
- Mustata, Ion. 2013. “Ac Ce P D Us T.” *Carbohydrate Polymers*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.009>.
- Norrihan, Binti Sam. 2008. “Isolation of Cellulose Fibers from Sugarcane Bagasse and Corn Cob and Preparation of Cellulose Nanocrystals from a Selected Pure Cellulose Source.” : 1–49.
- Quiminet. 2012. “The Various Uses of Carboxymethylcellulose (CMC) | Marketizer.com.” <https://www.marketizer.com/articles/the-various-uses-of-carboxymethylcellulose-cmc-2683164.htm> (July 12, 2017).
- Rachtanapun, P, P Simasatitkul, W Chaiwan, and Y Watthanaworasakun. 2012. “Effect of Sodium Hydroxide Concentration on Properties of Carboxymethyl Rice Starch.” 19(3): 923–31.
- Robles, José. 2009. “Colegio De Postgraduados.” *Coledio de Postgraduados*: 16–18.
- Romero, P et al. 2014. “Obtención de Celulosa Microcristalina a Partir Del Desechos Agrícolas Del Cambur (Musa Sapientum). Síntesis de Celulosa Microcristalina.” *Revista Iberoamericana de Polímeros* 15(6): 286–300.
- Roncillo, F, Milena Sierra A, and R Castro. 2012. “Rendimiento de Forraje de Gramíneas de Corte Y Efecto Sobre Calidad Composicional Y Producción de Leche En El Caribe Seco.”
- S. Rodríguez. 2007. “Pasto Elefante (Pennisetum Purpureum, Schumacher), Originario de África.” [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/FonaiapDivulga/fd12/texto/pasto\\_elefante.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd12/texto/pasto_elefante.htm).
- Saenz, A. 2013. “Química Orgánica Industrial.” <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-03.php> (June 28, 2017).
- Segura, F, R Echeverri, and A Mejía. 2008. “DELIGNIFICACIÓN SELECTIVA DEL PASTO Pennisetum Purpureum X Pennisetum Typhoides USANDO BASIDIOMICETOS LIGNINOLÍTICOS

SELECTIVE DELIGNIFICATION OF THE *Pennisetum Purpureum* X *Pennisetum Typhoides*.” : 41–50.

Van Soest, P; Robertson, J;, and B Lewis. 1991. “Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition.” 74: 10.

Van Soest, P; Wine, R. 1991. “Determination of Lignin and Cellulose in Acid-Detergen ^ CITEIN Fiber with Permanganate Determination of Lignin and Cellulose in Acid-Detergent Fiber with Permanganate.”

Tasaso, Penpun. 2015. “Optimization of Reaction Conditions for Synthesis of Carboxymethyl Cellulose from Oil Palm Fronds.” *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 6(2): 101–4. <http://www.ijcea.org/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=61&id=801>.

Terán, E; Escalera. 2007. “Centro de Investigaciones En Procesos Industriales Universidad Privada Boliviana.” 120(7): 107–20.

Urribarrí, L, A Ferrer, and A Colina. 2004. “Extracción Y Precipitación de Las Proteínas Solubles Del Pasto Elefante Enano ( *Pennisetum Purpureum* Schum Cv . Mott ) Resumen Introducción.” (4): 264–75.

Ververis, C. 2007. “Cellulose , Hemicelluloses , Lignin and Ash Content of Some Organic Materials and Their Suitability for Use as Paper Pulp Supplements.” 98: 296–301.



## CAPÍTULO VIII

### 8. APÉNDICE Y ANEXOS

#### Anexo 1 :Fotografías del Estudio



Figura 1. Análisis Fibra Detergente Neutro (FDN); Fibra Detergente Ácido (FDA).



Figura 2. Filtrado luego del Reflujo



Figura 3. Secado de Muestras



Figura 4. Pesado de Muestras



Figura 5. Método de Permanganato para obtención de Lignina



Figura 6. Método de Permanganato - Blanqueamiento

## AISLAMIENTO DE CELULOSA



Figura 7. Reflujo en Tallos



Figura 8. Reflujo en Hojas.



Figura 9. Lavado y  
Blanqueamiento de Celulosa



Figura 10. Pesado de Celulosa.

## PROCESO DE ELABORACIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA



Figura 11. Celulosa a partil de forrajes





Figura 12. Reflujo en Carboximetil Celulosa



Figura 13. Suspensiones en Metanol



Figura 14. Carboximetil Celulosa a partir de forraje.



Figura 15. Viscosidad medida en Jugo de Naranja



Figura 16. Viscosidad medida en Jugo con CMC

Viscosity Range at 25°C, <sup>(c)</sup> cps (mPas)	Designations for Indicated Substitution Types		
	7	9	12
<b>High—at 1% Concentration</b>			
2,500-6,000	7H4	9H4	
1,000-2,800	7H3S, 7HOF		
1,500-3,000	7H		
<b>Medium—at 2% Concentration</b>			
800-3,100			12M31
1,500-3,100		9M31	
400-800	7M	9M8	12M8
200-800	7M8S		
100-200	7M2		
<b>Low<sup>(d)</sup>—at 2% Concentration</b>			
25-50	7L		
<b>—at 4% Concentration</b>			
50-200	7L2		

Figura 17. Tipos de Viscosidad de Carboximetil Celulosa

Fuente: Aqualon CMC.

## Anexo 2: Análisis de Varianza.

### ANÁLISIS DE VARIANZA DE CELULOSA

Tabla 16. Análisis de Varianza para el % Rendimiento.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:% NaOH	377,931	1	377,931	241,12	0,0000
B:% EDTA	210,656	1	210,656	134,40	0,0000
AA	51,2747	1	51,2747	32,71	0,0000
AB	9,37028	1	9,37028	5,98	0,0191
BB	1,45393	1	1,45393	0,93	0,3414
bloques	0,915788	3	0,305263	0,19	0,8993
Error total	61,1291	39	1,56741		
Total (corr.)	676,465	47			

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

Tabla 17. Análisis de Varianza para el % de Alfa-celulosa.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:% NaOH	28,6024	1	28,6024	11,71	0,0015
B:% EDTA	45,2076	1	45,2076	18,51	0,0001
AA	128,334	1	128,334	52,54	0,0000
AB	5,90877	1	5,90877	2,42	0,1279
BB	0,0667815	1	0,0667815	0,03	0,8695
bloques	10,5617	3	3,52056	1,44	0,2455
Error total	95,2548	39	2,44243		
Total (corr.)	326,566	47			

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

Tabla 18. Análisis de Varianza - % Cenizas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:% NaOH	8,12123	1	8,12123	61,75	0,0000
B:% EDTA	7,11795	1	7,11795	54,12	0,0000
AA	3,59306	1	3,59306	27,32	0,0000
AB	0,0216568	1	0,0216568	0,16	0,6871
BB	0,163598	1	0,163598	1,24	0,2715
bloques	0,510515	3	0,170172	1,29	0,2901
Error total	5,12921	39	0,131518		
Total (corr.)	23,8655	47			

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.



## ANÁLISIS DE VARIANZA EN CARBOXIMETIL CELULOSA

Tabla 19. ANOVA - Rendimiento CMC

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:% NaOH	377,931	1	377,931	241,12	0,0000
B:% EDTA	210,656	1	210,656	134,40	0,0000
AA	51,2747	1	51,2747	32,71	0,0000
AB	9,37028	1	9,37028	5,98	0,0191
BB	1,45393	1	1,45393	0,93	0,3414
bloques	0,915788	3	0,305263	0,19	0,8993
Error total	61,1291	39	1,56741		
Total (corr.)	676,465	47			

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

Tabla 20. Análisis de Varianza para Grado de Sustitución.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:% NaOH	0,0266848	1	0,0266848	23,43	0,0001
B:MCA	0,00141116	1	0,00141116	1,24	0,2796
AA	0,161138	1	0,161138	141,46	0,0000
AB	0,00000111666	1	0,00000111666	0,00	0,9753
BB	0,00171947	1	0,00171947	1,51	0,2342
bloques	0,0018953	2	0,000947651	0,83	0,4504
Error total	0,0216422	19	0,00113907		
Total (corr.)	0,24151	26			

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

Tabla 21. Análisis de Varianza para Grado de Pureza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:% NaOH	37,9974	1	37,9974	2,70	0,1166
B:MCA	11,8098	1	11,8098	0,84	0,3708
AA	315,142	1	315,142	22,42	0,0001
AB	25,8331	1	25,8331	1,84	0,1911
BB	7,86157	1	7,86157	0,56	0,4637
bloques	12,8149	2	6,40745	0,46	0,6406
Error total	267,021	19	14,0538		
Total (corr.)	647,591	26			

Elaborado por: Antonieta Cazco . Statgraphics Centurion.

### Anexo 3 : Costos de Producción .

**Tabla 22. Costo de Producción de Celulosa**

Costos de Producción de 500 gramos de Celulosa			
Reactivos	Cantidad	Unidad	Costo (\$)
NaOH (25%)	19	L	20,17
Ácido Acético Glacial 10%	500	ml	0,17
Hipoclorito de Sodio 5%	250	ml	0,13
<b>Total</b>			<b>20,46</b>

Elaborado por: Antonieta Cazco .

**Tabla 23. Costos de Producción de Carboximetil Celulosa**

Costos de Producción de 1 Kg de Carboximetil Celulosa				
Reactivos	Cantidad	Unidad	Costos* (\$)	Costos** (\$)
Isopropanol	2800	ml	31,50	7,88
NaOH (50%)	560	ml	1,19	1,19
Ácido Cloracético	50	g	5,36	5,36
Metanol	200	ml	2,56	0,85
Etanol	200	ml	0,40	0,40
Ácido Acético Glacial	60	ml	1,22	0,41
<b>Total</b>			<b>42,23</b>	<b>16,09</b>

Elaborado por: Antonieta Cazco.

\*Costos sin reutilización de reactivos.

\*\* Costos con reutilización de reactivos (3 veces).

# **Anexos 4.**

## **Normas**

TABLE 1. Modifications of NDF.<sup>1</sup>

Source	Conditions	Reference cited in Macrae-Pereira (25)
Van Soest and Wine (53)	ND boil 1 h plus sulfite and decalin	A
Fomonbeck (10)	Peptin pH 2.2, 40 h at 55°C, boil detergent pH 3.5	
King and Traverser (21)	ND boil 2 h	
Schaller (17)	Pre-treatment with hog pancreas enzyme	B
Robertson and Van Soest (20)	ND boil 30 min, remove acid amylose, reboil 30 min, deplete decalin ± sulfite	
Robertson and Brink (19)		
Ogler et al. (13)	Boil in H <sub>2</sub> O 30 min, lactate 80°C with amylose 30 min, ND boil 1 h <sup>2</sup>	C
Wainman et al. (54)	Overnight with amylose 38°C ND boil 1 h <sup>3</sup>	D
McQueen and Nicholson (29)	Similar to D but with less enzyme <sup>4</sup>	E
Wainman (54) modified by Macrae-Pereira (25)	Incubate with amylose overnight, ND boil 1 h <sup>3</sup>	F
Ibid.		
Macrae-Pereira (25)	Incubate 30 min at RT <sup>5</sup> ND boil 1 h <sup>3</sup>	G
Ibid.	ND without EDTA + enzyme 15 min RT <sup>5</sup> , boil 1 h, add EDTA 5 min before ind <sup>3</sup>	H
Ibid.	Same as H except ND + EDTA used throughout <sup>3</sup>	I
Sills et al. (9)	Cut starch, amylose pH 4.6 overnight 38°C, ND boil 1 h	
Jones et al. (17)	Add .25 ml Fermentyl 120 <sup>6</sup> to ND boil 1 h <sup>3</sup>	
Van Soest and Robertson (21)	Starch samples in buffer mix + 2 ml Tenamyl <sup>6</sup> for 3 h at RT <sup>5</sup> , dilute with ND solution boil 1 min filter	

<sup>1</sup>ND = Neutral detergent.

<sup>2</sup>Uses sulfite and decalin and approved by the American Association on Cereal Chemists (37).

<sup>3</sup>Sulfite and decalin omitted.

<sup>4</sup>Recent temperature.

<sup>5</sup>Sigma amylose Number 5426, page 390, 1990 catalogue (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

size also is involved in the rumen buffering system along with nonstructural carbohydrates (NSC) and fiber quality.

#### METHODS FOR NDF

The insoluble fiber in feed includes the crosslinked matrix of the plant cell wall and, as coarse fiber, forms the rumen mat that stimulates rumen function. It is measured most conveniently as NDF, which includes cellulose, hemicellulose, and lignin as the major components. The original NDF method was applied to forages, and its subsequent application to starchy foods and feeds revealed interference by starch, thus presenting difficulties for the original neutral detergent (ND) method. Therefore, various modifications with amylose have been reported (Tables 1 and 2). Many of the commercial amyloses that have been used contain other activities, including hemicellulase,

$\beta$ -glucanase, and protease (25). In some of the modified methods, the sample is incubated overnight at 20 to 35°C with amylose. With this longer incubation time, contaminating enzymes in the inorganic amylose preparations can degrade hemicellulosic components in the feed, giving low values of NDF, whereas inclusion of unwanted starch leads to high values (25). Enzymatic preparations from *Bacillus subtilis* have been most popular. However, their quality and availability has varied over the recent years. The amylose (Sigma Type XI is no longer available) contained sufficient hemicellulase to affect values of wheat bran and possibly wheat straw (Table 3). Avoidance of this problem was accomplished by conducting starch digestion at the highest possible temperature. A newer *B. subtilis* enzyme presently available from Sigma is of lower activity, and more enzyme has to be used. The *B. subtilis* amylose is limited to a temperature

## SYMPOSIUM: CARBOHYDRATE METHODOLOGY, METABOLISM, AND NUTRITIONAL IMPLICATIONS IN DAIRY CATTLE

### Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition

P. J. VAN SOEST, J. B. ROBERTSON, and B. A. LEWIS  
Cornell University  
Department of Animal Science and  
Division of Nutritional Sciences  
Ithaca, NY

#### ABSTRACT

There is a need to standardize the NDF procedure. Procedures have varied because of the use of different amyloses in attempts to remove starch interference. The original *Bacillus subtilis* enzyme Type IIIA (XIA) no longer is available and has been replaced by a less effective enzyme. For fiber work, a new enzyme has received AOAC approval and is rapidly displacing other amyloses in analytical work. This enzyme is available from Sigma (Number A3306; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The original publications for NDF and ADF (43, 53) and the Agricultural Handbook 379 (14) are obsolete and of historical interest only. Up to date procedures should be followed. Triethylene glycol has replaced 2-ethoxyethanol because of reported toxicity. Considerable development in regard to fiber methods has occurred over the past 5 yr because of a redefinition of dietary fiber for man and monogastric animals that includes lignin and all polysaccharides resistant to mammalian digestive enzymes. In addition to NDF, new improved methods for total dietary fiber and nonstarch polysaccharides including pectin and  $\beta$ -glucans now are available. The latter are also of interest in rumen fermentation. Unlike starch,

their fermentations are like that of cellulose but faster and yield no lactic acid. Physical and biological properties of carbohydrate fractions are more important than their intrinsic composition. (Key words: dietary fiber, neutral detergent fiber, nonstarch polysaccharides)

Abbreviation key: AD = acid detergent, AIA = acid-insoluble ash, ND = neutral detergent, NSC = nonstructural carbohydrates, NSP = nonstarch polysaccharides.

#### INTRODUCTION

Refining dietary balances has provided an important way of optimizing animal production. Such progress has been most advanced with the monogastric species, poultry and swine. However, in the case of ruminants, progress has been slower because of the great modifying influence of rumen fermentation by rumen organisms, which have a fiber requirement and alter the amino acid balance. Fermentation in the rumen modifies the actual diet received by the ruminant animal, and the balancing of diets for ruminants must also consider fiber quality and the rumen microbial requirements. In addition, fiber is not a nutrient, chemically, or physically uniform material, which adds another dimension of complexity. Any system that sets fixed values for dietary fiber requirements is inadequate because rumen size and level of intake and production affect that requirement. Another factor affecting the fiber requirement is particle size, because two of the major functions of fiber are to stimulate rumination and ensilavalation and to form a normal rumen mat that functions as a filtering system and prevents too rapid passage of particles and loss of nutrients. Thus, particle

Received August 31, 1990.

Accepted February 6, 1991.

The best *Bacillus subtilis* (formerly Number 5426, has been changed by Sigma as of July 1991). The original procedure required 2 ml of this enzyme. The replacement, Number A3306, is four times stronger, and 50  $\mu$ l are used per sample.



TABLE 2. Descriptions of two neutral-detergent (ND) methods using differing operating conditions and two amylases.

Reference	Conditions		Amylase	
	ND-1	ND-2	ND-1	ND-2
Jencel et al. (17)	Single addition of heat stable $\alpha$ -amylase to ND solution, boil 60 min	ND solution for 30 min and then add 30 ml of ND solution and <i>Bacillus subtilis</i> $\alpha$ -amylase, boil 30 min	ND-1	ND-2
Robertson and Van Soest (36)	Heat stable $\alpha$ -amylase to ND solution, boil 10 to 15 min	Heat stable $\alpha$ -amylase to ND solution, boil 10 to 15 min	ND-1	ND-2

of 80°C and is rapidly inactivated at 100°C. The  $\alpha$ -1,6 activity also is destroyed by EDTA because it is calcium-sensitive. In some cases, the enzyme was added during and after the refluxing step to remove the starch (36). These modified methods increased the assay time by only 5 to 20 min but increased the number of steps in the ND procedure.

This new heat stable  $\alpha$ -amylase is stable to boiling detergent and is used to degrade starch in nondetergent chemical methods for dietary fiber (19, 35). This  $\alpha$ -amylase, which has AOAC approval (Number A3306 in the dietary fiber kit; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), has been used effectively in the ND method (16). The use of high temperature with a short-term amylase treatment has the advantages of minimizing the effect of unwanted side activities and is a more rapid procedure.

We have compared ND procedures using either *B. subtilis* amylase (36) or heat stable amylases (Tables 2 and 3). Both amylases

were effective in removing starch (16). Although wheat bran gave less NDF by the assay using the *B. subtilis* amylase, the starch content does not account for the difference (Table 3). The differences between NDF values for the samples cannot be attributed to starch; they probably reflect a loss in hemicellulose, as also noted by Maccarenhas-Ferreira et al. (25), who found even larger losses in hemicellulose with lower temperature treatments.

In the original ND method, starch removal was facilitated by using 2-ethoxyethanol. However, 2-ethoxyethanol (ethylglycol monoethyl ether or cellosolve) now is recognized as a health risk. Its use appears necessary for optimal removal of starch (16). Therefore, 2-ethoxyethanol should be replaced by a safer reagent. Use of triethylene glycol at the same concentration gives equivalent values and is on the safe list. Thus, even with the use of efficient amylases, addition of either 2-ethoxy-

ethanol or triethylene glycol seems necessary for concentrate feeds (16).

The NDF method has been criticized for not recovering pectin, which has been regarded by some as part of the cell wall matrix. Although a botanical argument can be made, the evidence from fermentation with gut microorganisms and digestion trials is that pectin is unique in being completely and rapidly fermentable and therefore is not, in contrast with hemicellulose, a part of the crosslinked lignified matrix (45). Pectin also possesses a very high cation exchange, at least in the demethylated form. Our view is that when pectin deserves recognition, it should be determined as its own entity. It is, however, a part of the nonstarch polysaccharides (NSP) discussed in this paper. The method using *meta*-hydroxybiphenyl (6) modified by Bucher (7) is specific for galacturonic acid and is a relatively simple procedure that can be conducted along with other fiber procedures.

#### Use of Sulfite

The use of sodium sulfite in the NDF procedure remains optional. Its purpose is to lower the protein level and remove keratinaceous residues of animal origin. Sulfite cleaves disulfide bonds and thus dissolves many cross-linked proteins. Its general use for ruminant feeds is discouraged, especially if the residues are to be used as an assay for ND insoluble protein, because the sulfite reaction is nonbiological. The ND and acid detergent (AD) insoluble proteins from animal products tend to be indigestible. Sulfite also attacks lignin and therefore should not be used in sequential analyses leading to lignin determination or when the residue is to be used for subsequent *in vitro* digestion with rumen organisms.

#### Lipid Interferences

Lipid contents above 10% are a problem for both ND and AD if a separate oil layer forms in the solution because the detergents are more soluble in the lipid phase than in water. High values of ADF and NDF result. Simple removal of lipid may be done by brief heating in ethanol and filtering on the pretreated crucible to be used subsequently for NDF or ADF. Contents and crucible are boiled in the NDF or ADF reagent as in the sequential procedure (31).

#### Filtration

There also are some kinds of samples that frequently offer filtering problems. These will be minimized if proper filtering techniques are followed. The lowest possible vacuum pressure should be used. Liquid should not be added while vacuum is on. Pressure is released when adding liquid. Contents are allowed to settle at least 15 s before admitting vacuum. In this way, finer matter is filtered onto a settled mat. The very hottest water is used, and the crucible should not be allowed to cool. The solution is returned to the beaker and reheated if necessary. If a crucible clogs, positive pressure should be exerted from beneath to flush particles out of the filter plate. This is also a

#### RECOMMENDED PROCEDURES

##### Procedure for NDF

**Procedure A.** A .5-g sample is heated to boiling in 100 ml of ND plus 50  $\mu$ l of heat stable amylase (dietary fiber kit; Sigma catalogue Number A3306) added before the beaker is placed on heat. Sodium sulfite (.5 g), if used, is added at this point. Sample is boiled 1 h and filtered on pretreated coarse sintered glass crucible or Whatman 54 paper (Whatman, Clifton, NJ). Because of varying soil contamination in forages and feeds, the ash content should be reported or excluded from the NDF. The starch-specific enzyme is stable to boiling. In sensitive to EDTA, and approved by the AOAC. Samples should be ground through a 1-mm screen, but not finer, because overgrinding also can worsen filtration.

**Procedure B.** An alternate procedure for removing starch from the most difficult samples is as follows: first the sample is treated with 30 ml of 8 M urea plus 50  $\mu$ l of amylase added to a 1-g sample; then it is stirred with a rod to break any lumps. The mixture may be heated briefly on a steam bath 80 to 90°C for 5 min. Then, it is incubated at room temperature for 4 h or overnight and diluted with 100 ml of ND solution; 50  $\mu$ l of enzyme is added option-

TABLE 3. Evaluation of two amylases in two neutral detergent (ND) methods. Analysis of NDF and the content of starch in NDF.<sup>1</sup>

Sample	ND-1 <sup>2</sup>		ND-2 <sup>2</sup>		Starch		ND-1 <sup>3</sup>		ND-2 <sup>3</sup>	
	NDF	SEM <sup>4</sup>	NDF	SEM <sup>4</sup>	(% DM)	SEM <sup>4</sup>	NDF	SEM <sup>4</sup>	(% DM)	SEM <sup>4</sup>
Timothy hay	65.5	1.31	66.3	0.98	0	0.98	66.3	0.98	0	0
Wheat bran	61.5	1.11	64.0	1.39	0	1.39	64.0	1.39	0	0
Alfalfa hay	46.8	0.97	47.1	1.13	0	1.13	47.1	1.13	0	0
Wheat bran, hard red	48.2	3.29	54.5	3.53	2	3.53	54.5	3.53	2	2
Corn silage	51.5	1.10	52.8	1.12	2	1.12	52.8	1.12	2	2
Oregon peas	15.7	1.12	16.5	2.1	2.1	2.1	16.5	2.1	2.1	2.1

<sup>1</sup>Adapted from Jencel et al. (19), values corrected for water content.

<sup>2</sup>*Bacillus subtilis* amylase old Sigma Type XIA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) is used in the ND-1 method described in Table 2.

<sup>3</sup>Robertson and Van Soest (36); heat stable  $\alpha$ -amylase is used in the ND-2 method described in Table 2.

<sup>4</sup>Mean of three replicated experiments.



recommended method for cleaning of crucibles. Crucibles can be tested after cleaning for the speed that liquid will flow. Inherently slowly filtering crucibles should be discarded.

#### Acid Detergent Fiber and Lignin

Acid detergent fiber is intended as a preparation for the determination of cellulose, lignin, ADIN, acid-insoluble ash (AIA), and silica. It is not a valid fiber fraction for nutritional use or for the prediction of digestibility. Summative systems are mechanistically valid and should replace empirical regressions (8, 45).

The ADF procedure was collaborated with the AOAC (44) and given first action. This procedure avoided the use of decalin. The Klason lignin procedure was collaborated at the same time. Since that time, the use of asbestos has been abandoned (36), allowing more flexible handling of sequential lignin procedures. Klason lignin is a better marker than permanganate lignin; however, sequential treatment, i.e., Klason lignin followed by treatment with permanganate, yields lignin by difference that is more recoverable in feces (51). The fraction is resistant to both 72% (w/wt)  $H_2SO_4$  and permanganate is cutin, which is important in many seed hulls and bark.

#### Acid-Insoluble Ash

Neutral detergent reagent dissolves pectin and biogenic silica but not siliceous soil minerals. On the other hand, AD precipitates pectic acid as the quaternary detergent salt and quantitatively recovers all silica (51). Acid-insoluble ash is conveniently measured as the residue from ADF after ashing at 525°C. It is a preferable procedure and shorter than that of Van Keulen and Young (42), which is liable to incomplete recovery of silica due to lack of sufficient acid dehydration (51). The insoluble ash after lignin determination by either  $KMnO_4$  or Klason procedures is identical to that of the original ADF, provided that asbestos or other filter aids are not used (49).

#### Sequential Analysis

The sequential analysis for fiber fractions is attractive because important interferences can be avoided and because the use of sample is

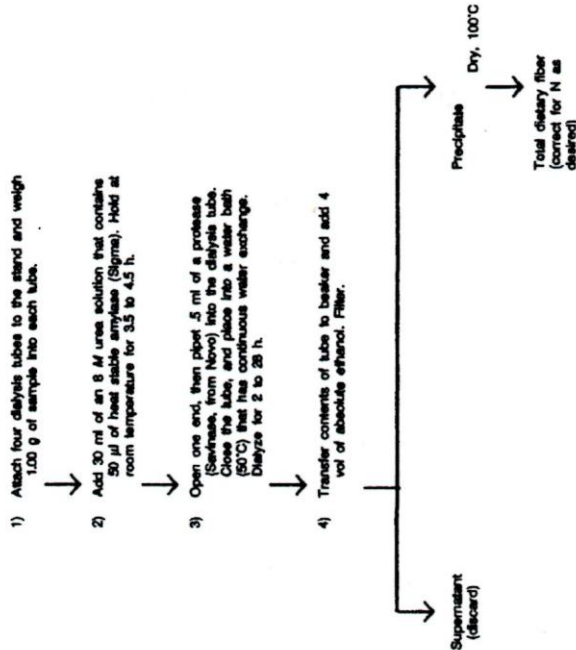


Figure 1. Diagram outlining the principal steps of the procedure for total dietary fiber (19). Courtesy of Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

some storage polysaccharides, such as galactans in beans and sundry other gums and mucilages.

The definition of total fiber has led to appropriate enzymatic procedures isolating the fractions resistant to amylases and proteases. The first of these is the Asp procedure (35) adapted and collaborated by the AOAC. This method digested the heat-gelatinized sample with heat stable amylase, amyloglucosidase, and a protease. The final undigested fraction is precipitated by 4 vol ethanol. The residue is corrected for N  $\times$  6.25 and for ash.

The AOAC procedure offers many problems because hydrolyzed products remain in the solution. Their occlusion by ethanol precipitation is a major problem. Interference by Na

and Ca salts (from the sample and the buffers used), which are insoluble in alcohol, often leads to more ash in the fibrous residue than present in the original sample. Volatile loss of ash components upon ashing at 525°C is prone to overestimation of fiber.

Because of these problems, various modifications of the method have been proposed. We have developed a new procedure involving urea-enzymatic dialysis, which avoids heat treatment and removes products via dialysis. The principle of the method depends on the extraordinary activity of the heat stable enzyme in 8 M urea. The schematic of the method is shown in Figure 1. Detailed information on the urea-enzymatic dialysis procedure is available (19).

TABLE 4. A listing of major carbohydrates in NSP<sup>1</sup> and NSC<sup>2</sup> (45).

Carbohydrate	Main occurrence	Water solubility	Classification <sup>3</sup>
Sucrose	All plants	+	nonstructural
Pectins	Composites, grass and composites	±	nonstructural
Starches	Cereals	±	nonstructural (storage)
Galactans	Legume seeds (ryebans)	+	nonstructural, NSP (storage)
β-Glucans	Bleed cell	+	structural, NSP
Pectins	Legumes and other dicots	±	structural, NSP

<sup>1</sup>Nonstarch polysaccharides.

<sup>2</sup>Nonstructural carbohydrates.

<sup>3</sup>From the aspect of function in the plant.

**Method for Pectin**

This procedure according to Bucher (7) is a modification of that of Blumentranz and Asboe-Hansen (6) and is improved with respect to the specificity for galacturonic acid over glucuronic acid. The procedure does not measure arabinos that may be associated with pectin.

**Reagents.** Reagents include concentrated sulfuric acid (AR), sodium hydroxide solution (.5% NaOH, w/w), and *meta*-hydroxydiphenyl reagent [.15% *m*-phenylphenol, w/vol (Eastman Kodak, Rochester, NY) in .5% NaOH, w/w].

**Procedure.** Aliquots (.5 ml) of sample solution containing 5 to 20 μg of uronic acid per aliquot are pipetted into test tubes (15 x 25 mm) in quadruplicate, and the tubes are placed in an ice bath for at least 10 min. Concentrated sulfuric acid (3 ml) at room temperature is pipetted into each tube, and the tubes are immediately returned to the ice bath for at least 5 min. The tubes are then mixed by vortexing and placed in an 80°C shaking water bath for exactly 8 min. The tubes are removed and cooled at room temperature. *Meta*-hydroxydiphenyl reagent (50 μl) is added to one pair of tubes, and NaOH solution (50 μl) is added to the second pair for a control. All tubes are vortexed for 10 s and held at room temperature for a few minutes to ensure complete color formation and to allow bubbles to dissipate. Absorbances are read at 520 nm in a spectrophotometer within 1 h of mixing (timing is important). The samples are corrected for the blank readings. The galacturonic concentration is calculated by reference to a galacturonic acid standard curve that follows the Beer-Lam-

bert Law up to 35 μg/ml of sample solution (17.5 μg/aliquot). A set of standard galacturonic acid solutions is assayed simultaneously with each set of samples.

**Nonstructural Carbohydrates and Nonstarch Polysaccharides**

The more readily digestible carbohydrates in animal feeds lack a satisfactory system of classification. However, they are the major energy yielding components of feeds. This lack of definition arises from their diversity and from the relative lack of basic research into their specific nutritive characteristics. Generally speaking, they comprise those carbohydrates not included in the cell wall matrix and are not recovered in NDF, and they include sugars, starches, fructans, galactans, pectins, β-glucans, etc. The sum of these is NSC. This value minus starch and sugars equals NSP. The NSP do not include native hemicelluloses and celluloses that ordinarily are a part of the lignified cell wall matrix, which recovers hemicellulose and cellulose, although their fermentation characteristics in the rumen are similar (41).

The NSC divide into sugars, starches, and the NSP (Table 4). Soluble carbohydrate is an ambiguous term because of the characteristics of starches, some of which are insoluble. Many carbohydrate chemists consider pectin in the structural group, but, for purposes of nutritional classification, it fits the NSP criteria. Pectins are important in grasses and cereals but are significant in dicotyledonous species, including forages and seed products. Legumes are the most important family.

The collective term soluble carbohydrates is not definitive, because some resistant starches,

for example, are quite insoluble and even indigestible (9). In speaking of solubility in reference to physical properties, ease and degree of solubility of nutrients in the rumen and in other parts of the digestive tract of farm animals have a major effect on dietary quality and digestive efficiency for both ruminants and nonruminants, although the respective physical factors affect these two groups of animals somewhat differently. The major factors affecting solubility and ease of digestion, but not necessarily intercorrelated, are crystallinity and macromolecular structure. Because these technical topics transcend the scope of this paper, some references are given (4, 9, 12, 39, 45).

The soluble NSC are digested rapidly and almost completely fermented in the rumen (90 to 100%). The insoluble, resistant starches may escape. It can be argued that an NSC value including pectin is more appropriate because it is a rapidly digested carbohydrate. This would cause these can elicit good rumen efficiencies

When large amounts of starch and sugar are added, the fermentation pathway can switch to a lactic acid production, which can lead to acidosis. However, other soluble NSP, such as pectins, arabinos, and β-glucans, are not fermented to lactate (41). Hence, there is merit in distinguishing those feeds containing NSP because these can elicit good rumen efficiencies

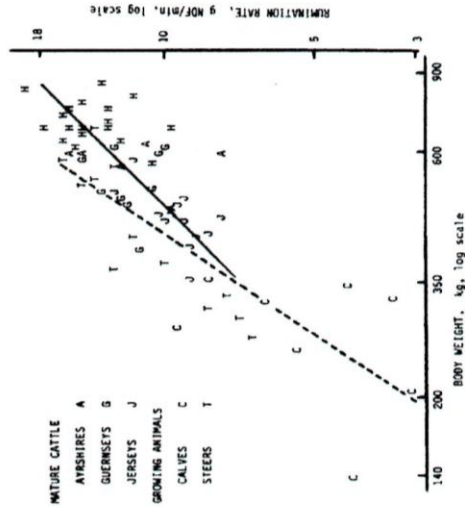


Figure 2. Logarithmic plot of retention capacity (grams) of NSP per minute and BV of cattle. Regression slope for mature cattle is .35 and not significantly different from unity. Regression slope for immature and growing animals is 1.50. Data listed are the greater chewing efficiency of larger animals. Calculated from data of Blar et al. (5) and Welch (57) and unpublished figures.



TABLE 3. The NDF and ADF equivalence for alfalfa and corn silage based on NRC (13).

Fiber Source	NRC <sup>1</sup>	Alfalfa composition		Diet level		Diet level <sup>3</sup>
		composition	(% DM)	composition <sup>2</sup>	level	
NDF	28	47	60	47	60	60
ADF	21	35	60	28	75	75

<sup>1</sup>Recommended minimum dietary level for cows in early lactation.

<sup>2</sup>Percentage of DM.

<sup>3</sup>Level necessary to provide fiber requirement from the forage source.

without the problems associated with too much starch (46). The  $\beta$ -glucans that occur in oats and barley contribute to gumminess and are objectionable in poultry diets (3) but probably are beneficial in ruminant diets. See Jeraci and Lewis (18) for methods for  $\beta$ -glucans.

Because NDF and non-NDF carbohydrates represent the bulk of most feedstuffs, variation in the ratio of non-NDF carbohydrate to NDF carbohydrate has become a basis for ration adjustment (22). At least two systems have been proposed for dairy cattle that utilize aspects of this concept. One based on soluble carbohydrate has been patented (34), and another based on NDF (31) has been used for ensuring adequate rumination and efficient milk production. There is, at present, no system that takes into account the contrasting qualities of the so-called soluble carbohydrates, the NSC, or the NSP.

When the ratio of forage to concentrate is decreased (less than 50% in the diet, balancing rations for NSC becomes important for high producing cows. This problem is more likely to occur with grass- or corn silage-based diets than with legume hay. Starch and sugars can be measured directly (22). The net fraction can be reasonably calculated by difference using one of two formulas (34): 1)  $NSC = 100 - [(NDF + protein + fat + ash) + NSC = 100 - [(NDF - NDF\ protein) + protein + fat + ash]$ .

They have the disadvantage that NSP are included. They also may not work on silages in which sugars are replaced by fermentation products. The second equation recognizes that in some feedstuffs the protein is not totally extracted by detergent. The insoluble protein in NDF is the slowest to be degraded (52) and should therefore be excluded. This calculated NSC is quite close to determined starch and

sugar values for many feeds but is larger when the feedstuff contains significant quantities of NSP, which includes pectins. Pectins are important in citrus, beet pulp, and legume forages but are low in grass forages. Oats, barley, rye, and triticale contain  $\beta$ -glucans. The NSP can be estimated by difference from total dietary fiber and NDF. The residues should be corrected for protein and ash.

#### The Fiber Requirement

Ruminants generally and dairy cattle in particular require adequate coarse insoluble fiber for normal rumen function and maintenance of normal milk fat test. Normal rumen function in dairy cattle is associated with adequate rumination and cellulose digestion. These maintain rumen pH and cellulolytic microorganisms that characteristically produce the higher acetate to propionate ratios needed for normal lipid metabolism in the cow. Daily rumination time is directly proportional to coarse NDF intake and related to body size (Figure 2) (5, 55). Other estimations of fiber, e.g., ADF or crude fiber are less well related, because only NDF quantitatively recovers insoluble matrix carbohydrates, including hemicellulose. The NDF is better related to intake and gastrointestinal fill than any other measure of fiber (30, 45), thus, the expectation that the fiber requirement is better expressed in terms of NDF rather than ADF or crude fiber. This point is illustrated by the experiments in terms of Welch (56) at the University of Vermont, who examined the ability of various forages to promote rumination. The best relationship was with intake of NDF that was correlated at .99 with chewing time.

The NRC requirements for dairy cattle (33), while allowing different levels of fiber relative

to production, set fixed levels of NDF relative to ADF for lactating cows. This system fails to reflect that the ratios of hemicellulose to cellulose vary widely between feed fiber sources, particularly in the all important corn silage and alfalfa that are the basis of many rations (Table 5). The recommendations are inconsistent with well-established knowledge. It is apparent that the NRC levels for ADF were based on alfalfa, because they do not fit corn silage. Use of the NRC recommendation for ADF will result in overfeeding of fiber in the case of corn silage, grass silages, and hays.

Although coarse NDF of any sort will satisfy the rumination requirement, the quality of that fiber has important effects on the rumen environment and on microbial efficiency. Beyond particle size and adequate levels of NDF, additional factors of buffering capacity, cation exchange, and fermentation rate are important food and fiber properties needing consideration. Because NDF is not a uniform material, other physicochemical descriptions become important nutritional considerations. The quality of NSC and the proportion of starch and sugar relative to other NSP, such as pectin, have major influences on rumen microbes and efficiency. These factors, net fermentation rate, type and amount of fibrous and nonfibrous carbohydrates, along with the N and protein supply interact to affect rumen function and microbial efficiency.

#### Cation Exchange and Buffering

The most important feed characteristic besides particle size that contributes to net rumen buffering is the buffering capacity of the feed; this depends on cation exchange capacity of the fiber and, to some extent, on the fermentation of protein to ammonia. Ion-exchangeable groups in plant cell walls include carboxyl, amino, free aliphatic hydroxyls, and phenolic hydroxyls, all of which have some affinity for binding of metal ions (Table 6). Thus, the surface properties of fiber, hydration, and cation exchange are intercorrelated ( $r = -.7$ ) and are likely associated with short lag times and rapid rates of cell wall fermentation. Microbes that have negatively charged cell walls (23, 24) "recognize" fibrous particles through their exchangeable surface and form attachments (1), which require divalent cation liganding (prob-

TABLE 6. Correlation coefficients (r) of cation exchange capacity determined with copper (II) and praseodymium (III) at specified pH of batch-isolated neutral-detergent fibers (26).

Parameter	Cu (II)		Pr (III)	
	pH 3.5	pH 7.0	pH 3.5	pH 7.0
Lignin, %	.76**	.69**	.69**	.84**
Hemicellulose, %	.49	.56†	.48	.48
Cellulose, %	.11	.03	.16	.16
N, %	.70†	.50†	.58†	.58†
Pr at pH 3.5		.56**		.94**

† $P < .10$ .

\*\* $P < .05$ .

\*\*\* $P < .01$ .

ably magnesium). Cation exchange is the ability of fiber to bind metal ions on its surface in much the same way that clay minerals are able to hold cations in soil. The exchange serves as a bank, exchanging  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$ , and  $Mg^{++}$  for  $H^+$  when pH drops and recharging when new cations become available as saliva and ingesta are mixed. An advantage of this regenerative bank is that ruminant fiber, as it passes down the digestive tract, contributes buffering action farther down the gut. If the pH rises in the rumen, the bank is recharged with metal ions, and the bound ions are prevented from washing out of the rumen by their attachment to coarse fiber.

Mature legume forages are the most effective dietary ingredients for supplying exchangeable buffering capacity (Table 7), although some concentrate fibers are as good or better. Corn silage has only about one-third the capacity of alfalfa and also contains starch, which can promote lactic acid production.

The buffering capacity of feedstuffs derives in part from the physical effects that they elicit in the rumen and on rumination. Because the fermentation of carbohydrates leads inevitably to production of large amounts of VFA, their removal by absorption and the recycling of mineral ions are essential processes in the maintenance of pH and normal rumen environment. Fiber is among the more slowly digesting solid fractions and contributes most to the maintenance of normal rumen environment. More rapidly fermenting feeds yield organic acids at a faster rate, thus taxing the buffering system to a greater degree. Mature grasses are



TABLE 7. Cation exchange capacity (CEC) values for a range of foodstuffs and levels of NDF and DM required to yield equivalent exchange capacity of 1 mol (100 g) calcium carbonate (27).

Feedstuff	NDF (%)	CEC (meq/100 g)	Calcium carbonate equivalent	
			NDF Basis	DM Basis
Alfalfa hay	45	50	4	9
Bladderfoot trefoil	65	30	6	10
Coastal bermuda grass	70	11	17	25
Corn silage	44	15	13	30
Concentrated meal	29	57	4	12
Distillers grains	50	35	6	11
Dried brewers grains	62	29	7	11
Guinea grass	72	22	10	13
Haycrop silage	43	25	8	19
Oats	37	17	12	31
Rapeseed meal	26	100	2	8
Road canarygrass	49	21	4	12
Ryegrass	41	24	8	20
Safflower meal	60	20	10	16
Soybean meal	12	41	5	40
Sugar beet pulp	51	70	3	5
Sunflower meal	19	37	5	29
Timothy hay	63	30	7	11
Wheat straw	80	13	15	19

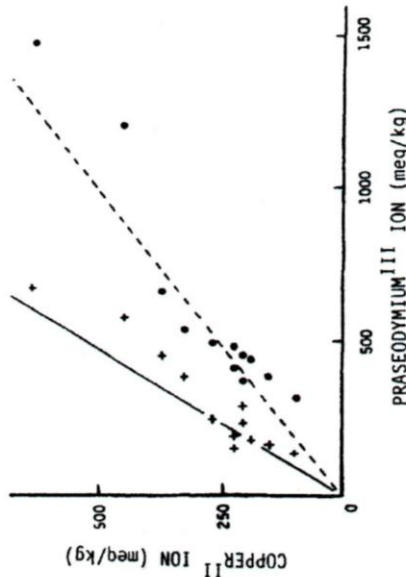


Figure 4. Comparison of three different measurements of cation exchange: copper II at pH 3.5 and praseodymium III at pH 3.5 (—) and 7.0 (---) (49). Courtesy of Walter de Gruyter Press, Berlin, Germany.

change capacity obtained by Cu and Pr are shown in Figure 4 and are approximately equal at pH 3.5; values at pH 7.0, obtainable only with Pr, are about double those at pH 3.5. These data are in agreement with Figure 3 data in that about half of the potential cation exchange lies between pH 3.5 and 7. Copper is attracted by unionized amino groups, for which the rare earth has little affinity. Both Cu and Pr have high affinities for phenolic groups, and the exchange values have high correlations with lignin content (Table 6).

The exchange retards mineral ion absorption and delays washout from the rumen to the extent that the exchange is associated with the coarse, lignified fiber. Thus, association with lignin helps maintain the reservoir of buffering exchangeable cations in the rumen. Lignin also is associated with crosslinking of cell wall carbohydrates and inhibits particle size breakdown by rumen organisms, thus, an essential feature of coarse fiber. It can have positive functions in the rumen in contrast with its dominant role in lowering digestibility. There probably is a lignin requirement for the rumen, but it cannot be so high as to limit availability of dietary energy excessively.

Rates of Fermentation

There are important relationships between rates of fermentation of the respective carbohydrates and microbial efficiencies, i.e., production of microbial protein per unit of feed digested in the rumen. Rate of fermentation sets the amount of feed energy per unit time for rumen bacteria. Faster digestion rates provide more food such that the effect is similar to that of plane of nutrition for animals, whereby the extra food dilutes maintenance, leaving more for growth and production (40).

Rate of digestion has been measured by the ND modification of the Tilley and Terry *in vitro* rumen procedure (14), in which times of digestion are measured from 6 to 96 h (30). Combination of this information with expected intake and passage has led to the discount concept of calculating net energy (48) and overall ration balancing by matching carbohydrate and protein digestion rates in the Cornell carbohydrate protein model (11).

The range in digestion rates versus rumen microbial yield of various carbohydrates is shown in Figure 5. Cellulolytic bacteria are more efficient because of their lower maline-

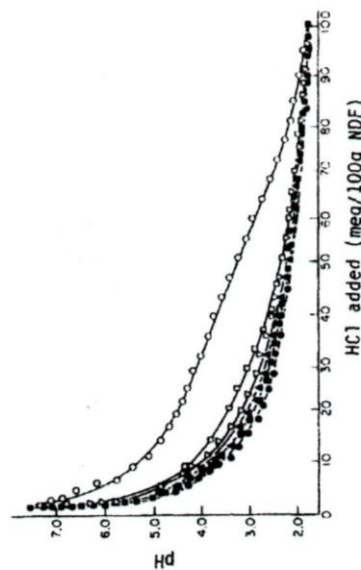


Figure 3. Titratable acidity of plant cell walls from pH 7.0 to 2.0 with 1N HCl. Symbols: ●, timothy hay; ■, oats; ▲, maize silage; □, wheat middlings; ○, alfalfa hay. Note the greater buffering capacity of alfalfa (27). Courtesy of the Journal of the Science of Food and Agriculture, Elsevier Science Publishers, Barking, Essex, England.

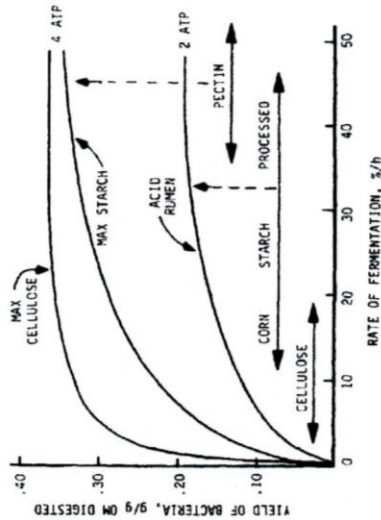


Figure 5. The relationship between the amount of microbial protein produced per unit of feed fermented in the rumen in relation to rate of fermentation. Bacteria in a normal rumen ferment carbohydrates to VFA with a yield of 4 ATP from 1 glucose. Lactic acid production (lower curve) is characteristic of acidic rumens and yields only 2 ATP/mol of glucose.

nance cost. The rate of digestion dilutes the maintenance cost for all rumen bacteria, and digestion, but pectins may impose this penalty. Pectin is high in citrus, beet pulp, and alfalfa, but there is very little pectin in most grasses and corn silage.

The character of pectin fermentation results not only from a lack of lactic acid output but also from the nature of the galacturonic acid structure that provides potential buffering through cation exchange and metal ion binding. Alfalfa contains 5 to 10% pectin as calcium pectate, and larger amounts occur in citrus and beet pulp as the methyl ester, which is hydrolyzed in the rumen to produce metal ion-binding capacity. In view of the faster fermentation rates of pectins, these physicochemical characteristics probably account for some of the "magic" effect observed when pectin-containing feeds are added to high starch diets.

Cereal grains are the basis for much animal feeding, and, because starch is the major component, starch quality affects feed efficiency. Starches vary in seeds according to physicochemical structure. Linear forms such as amylose are more crystalline and are digested more slowly. There is much genetic variation in cereal grains, which may account for differ-

ences between sources. For ease of degradation (45), uncooked starches rank in the following order: wheat, barley, oats greater than corn, and sorghum greater than legume. Response to processing is in approximately the reverse order (15). The potential rate of fermentation of all carbohydrates largely determines their fate in the digestive tract and the efficiency with which microbes can use them.

CONCLUSIONS

Fiber has come to be recognized as a required dietary ingredient for many herbivorous animal species and is necessary for normal rumen function in ruminants. Quality of fiber varies according to fermentability, particle size, and buffering capacity. Only coarse insoluble fiber is adequate for promoting rumen function. This corresponds to the NDF from forages, and NDF is the preferred measure for ruminant feeds and dietary balancing programs. Therefore, the standardization of procedures for NDF is of paramount importance. Recommended procedures have been provided. Nonstructural carbohydrate in ruminant feeds also can have impact on dietary quality and microbial efficiency in the rumen, and computerized systems for using both NDF and the NSC have been proposed (11, 34). The NSC can be further subdivided into those carbohydrates (starch and sugar) capable of yielding lactic acid and those not yielding lactic acid, because lactic acid production has major impact on rumen efficiencies. The latter (NSP) include pectins, galactans, and  $\beta$ -glucans.

REFERENCES

1 Akin, D. B. 1980. Evaluation by electron microscopy and aerobic culture of types of rumen bacteria associated with digestion of forage cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:242.  
 2 Allan, M. S., M. I. McBurney, and P. J. Van Soest. 1985. Cation exchange capacity of plant cell walls at neutral pH. *J. Sci. Food Agric.* 36:1065.  
 3 Anson, P., and R. Beaman. 1983. An enzyme method for analysis of total mixed linkage beta glucans in cereal grains. *J. Cereal Sci.* 3:231.  
 4 Appuhn, G. O. 1983. Structural chemistry of some nonacetyl polyaccharides of carrots and apples. Page 33 in *Unconventional sources of fiber*. Paris, ed. Ann. Chem. Soc., Washington, DC. *Symp. Ser.* 214, 1.  
 5 Bae, D. H., J. G. Welch, and A. M. Smith. 1979. Forage intake and rumination by sheep. *J. Anim. Sci.* 49:1292.

6 Blumensatz, N., and G. Aboe-Hussen. 1973. A new method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54:84.  
 7 Becker, A. C. 1984. A comparison of solvent systems for extraction of pectic esterase from fruits and vegetables. M. S. thesis, Cornell Univ., Ithaca, NY.  
 8 Conrad, H. R., W. P. Weiss, W. O. Oborogo, and W. L. Shoberg. 1984. Estimating net energy demands from composition of cell walls and cell walls. *J. Dairy Sci.* 67:427.  
 9 Engvall, H. N., and G. T. McPartlan. 1986. Breakdown of resistant and readily digestible starch by human gut bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 37:699.  
 10 Fomon, R. V. 1976. Estimating relative value from chemical analyses. Page 219 in *In Vit. Symp. Food Composition and Nutrient Requirements*. L. E. Harris and L. C. Kestel, ed. Utah State Univ., Logan.  
 11 Fox, D. G., C. J. Saffren, J. D. O'Connor, J. B. Russell, and P. J. Van Soest. 1990. The Cornell net carbohydrate and protein system or evaluating cattle diets. *Search Agric. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. No. 34*, Ithaca, NY.  
 12 French, D. 1973. Chemical and physical properties of starch. *J. Anim. Sci.* 37:1048.  
 13 Gilger, S., M. Dorison, and D. Sarvant. 1981. Adaptation of the Van Soest method to a routine determination of concentrate feedstuffs. *Comm. Eur. Commun. Workshop Methodol. Anal. Feedstuffs Ruminants*. European Van Soest Ring Test. Rep. meeting to discuss analytical needs. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food, Slough Laboratory, Lond., Engl.  
 14 Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agric. Handbook No. 379*, ARS-USDA, Washington, DC.  
 15 Hake, W. H. 1973. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. *J. Anim. Sci.* 37:1075.  
 16 Jersel, J. L., and P. J. Van Soest. 1990. Improved methods for analysis and biological characterization of fiber. *Adv. Exp. Med. Biol.* 270:245.  
 17 Jersel, J. L., T. H. Rasmussen, J. B. Robertson, and P. J. Van Soest. 1989. New and improved procedures for neutral-detergent fiber. *J. Anim. Sci.* 66(Suppl. 1): 351(Abstr).  
 18 Jersel, J. L., and B. A. Lewis. 1989. Determination of soluble fiber components: (1- $\rightarrow$ 3), (1- $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucans and pectins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 25:15.  
 19 Jersel, J. L., B. A. Lewis, P. J. Van Soest, and J. B. Robertson. 1989. New urea enzymatic dialysis procedures for total dietary fiber. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72:977.  
 20 Kellison, M. J. H., and W. Plunk. 1974. Some problems in the analysis of pectin in potato tuber latex. *Potato Res.* 17:169.  
 21 King, R. H., and M. R. Taverner. 1975. Effect of time of digestion with NDF solution on the yield of fibre from various feedstuffs. *Anim. Prod.* 21:284.  
 22 MacGregor, C. A., M. R. Stokes, W. H. Hoover, H. A. Leonard, L. L. Jenkins, F. C. Saffren, and R. W. Millman. 1983. Effect of dietary concentration of total nonstructural carbohydrates on energy and nitrogen metabolism and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 66:39.  
 23 Merqui, R. E., K. Meyers, and E. L. Carstensen.



## Determination of Lignin and Cellulose in Acid-Detergent Fiber with Permanganate

By P. J. VAN SOEST and R. H. WINE (Animal Husbandry Research Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Md. 20705)

A newly developed indirect method for lignin, utilizing permanganate, permits the determination of cellulose and insoluble ash in the same sample. The new permanganate lignin method is intended as an alternative procedure to the 72% sulfuric acid method over which it offers definite advantages as well as certain disadvantages. Choice of methods will depend upon the materials analyzed and the purpose for which the values are to be used.

Acid-detergent fiber is essentially composed of lignin, cellulose, and insoluble minerals, mainly silica (1, 2). While all of these components are of nutritional importance, silica that is metabolized by plants is responsible for a marked decline in nutritive value compared to that associated with lignin (3). Consequently, a method partitioning acid-detergent fiber with respect to lignin, cellulose, and minerals would be of considerable utility.

Lignin by the 72% sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ) method is measured as the loss in organic matter upon ashing; this method requires the use of asbestos as a filter aid, which causes the sacrifice of the sample for any other purpose.

This situation might be improved if a reagent could be provided that would dissolve lignin but leave cellulose and ash. The cellulose should retain fiber structure and require no filter aid. Cellulose could be estimated as the loss upon ashing, and the mineral residue would remain for further examination.

Potassium permanganate is known to oxidize lignin and other aromatic and unsaturated extractives at room temperature while having little effect on structural carbohydrates (4). Buffered permanganate has been used as a lignin-specific stain in electron microscopy of plant tissues (5). The use of permanganate as a delignifying agent would have advantage over other procedures

(6) that require special conditions such as elevated temperatures or pressure. Permanganate oxidation has long been the basis of permanganate number methods for estimating lignin content of wood pulps. Published methods that use standardized permanganate are of two types: those that measure the decolorization end point by titration, and those in which excess permanganate is determined after a fixed time of reaction (6). In all these methods permanganate autocatalytically decomposes with time, so that the time interval and end point detection are arbitrary, while the oxidation equivalent of lignin is obscure. Consequently, values can be quoted only in terms of amount of reagent used and are correlated only with lignin content.

In this study a different approach was made: Interfering matter was removed by preparing acid-detergent fiber, and lignin was oxidized by treatment of the fiber with a concentrated buffered permanganate solution in the crucible without transfer. The fiber was demineralized with alcoholic hydrochloric and oxalic acids, and the loss in organic constituents was recorded. This approach measures lignin gravimetrically and avoids the problems of titration and decomposition of permanganate in side reactions.

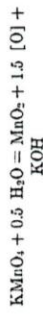
### Preliminary Studies

#### Reaction Factors

Initial studies on rates of lignin oxidation were frustrated by resistance of some acid-detergent fibers to wetting by the permanganate solution. This problem was eliminated by adding 10-15% tertiary butyl alcohol to the permanganate reagent.

The effects of time, pH, and concentrations of reagent components necessary to the proper function of the delignification were studied in relation to the rate of reaction and specificity of permanganate for lignin. Effective control of pH requires a high con-

centration of buffer relative to permanganate concentration because of alkali formation in the reaction:



Manganese reduces to the tetravalent state in the form of insoluble manganese dioxide ( $MnO_2$ ) in neutral and weakly acidic solutions. Choice of buffers was severely limited by the requirements of high solubility (about 3M) and stability toward permanganate. Acetate (maximum buffering pH 4.8) and chromate (maximum buffering pH 6.5) were satisfactory. Phosphate was unsatisfactory because it chelated deposited manganese and yielded a gummy unfilterable residue. Buffers were added to saturated potassium permanganate before use because the mixed solution was not stable for more than a day.

Rate of reaction proceeded more rapidly at lower pH, and as a result, 3M acetic acid, which is convenient and cheap, was chosen as one buffer in the remainder of the studies. Completeness of lignin oxidation was indicated by a negative Mäule reaction (7, 8). Apparently, the principal factor that limits the rate of reaction is the diffusion of the permanganate into fiber particles; the positive Mäule reaction was observed to disappear last from the center of the particles. The rate of penetration was also slower in materials of high lignin-cellulose ratio. Materials of low lignification (most grasses) were rapidly delignified, while materials of higher lignification required a longer time; 90 minutes was satisfactory for most common feeds but unsatisfactory for woods, fescues, and barks in which the lignin content of acid-detergent fiber exceeded 35%. Particle size was also a critical factor; large, poorly penetrated particles yielded low results.

Attempts to measure rate of reaction by amount of residue that was insoluble in 72%  $H_2SO_4$  were unsuccessful because most plant materials have an organic fraction that is insoluble in 72% acid and unreactive toward permanganate. This fraction, apparently cutin and wax (9), was more abundant in fescues, seed hulls, and surface parts of plants. The amount of this substance remained con-

stant after oxidation for 90-90 minutes, and prolonged treatment (up to 7 hours) failed to change it, although there appeared to be a serious loss of carbohydrate constituents in the latter case. Loss of cellulosic carbohydrates was evidenced by a positive anthrone reaction on extracts of the permanganate filtrate.

Cellulosic carbohydrates were lost (anthrone reaction) at 90 minutes in immature grasses with high values of apparent lignin when flow of solution through crucibles was unrestricted. Apparently the permanganate solution slowly attacks grass cellulose. This effect was not evident in Whatman No. 41 paper nor in forages of higher lignin-cellulose ratio. To control loss the crucibles were placed in a pan of water (2-3 cm deep) and exactly 25 ml of permanganate solution was immediately added; the water level in the pan was then raised to restrict flow from crucibles.

Although monovalent silver is known to catalyze permanganate oxidations (10), little increase in rate was observed. However, silver unexpectedly decreased autocatalytic decomposition of permanganate (Fig. 1). Time to decomposition, as measured by appearance of a precipitate, was related to silver concentration. Silver also increased stability of the buffered permanganate solution relative to temperature; therefore, 0.0003M silver nitrate was included as a reagent. Since silver was irreversibly deposited in the cellulose fiber, the utilizable

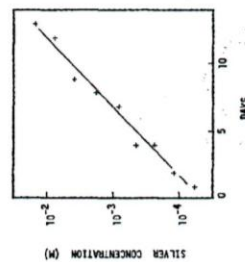


FIG. 1.—Effect of silver concentration on the stability of 0.021M permanganate in 3M acetic acid. Time to decomposition measured as days to the appearance of a precipitate.



concentration was limited to that which was below gravimetric detection.

Lignin results were essentially unaffected by temperatures between 20 and 32°C. However, reaction was difficult to manage at the higher temperature (about 30°C), i.e., gas evolved with foaming and the sample sometimes spilled over the sides of the crucible. Consequently, temperature was kept below 25°C and crucibles were not filled more than half-full (25 ml). At temperatures below 18°C, oxidation of lignin appeared incomplete (Mäule reaction), and lower results were obtained.

#### Demineralsation

Either oxalic or hydrochloric acid solutions could be used to remove  $MnO_2$  from the cellulose fiber; a mixture of both acids seemed to improve speed. Ethanol (70%) was included in the mixture to eliminate possible loss of cellulose carbohydrates, and the demineralizing solution was added directly to the crucibles with no washing after permanganate solution had been filtered off. When ethanol and hydrochloric or oxalic acids were used at higher concentrations than stated in the method below, cleanup was slower.

A definite water concentration was required to efficiently remove  $MnO_2$ . Water was also a factor in the efficiency of the ethanol wash used to remove residual acid. Ethanol (95%) or acetone failed to remove adsorbed acid; this failure caused the cellulose to blacken upon drying and weight was lost. Thus, 20% water was included in the alcohol for washing.

Another problem was a white manganese oxalate precipitate that appeared during the demineralization step in about a quarter of the cases. Its appearance caused the weight of the precipitate to exceed the lignin loss. Investigations of the effects of transition metal salts upon the permanganate oxidation showed that precipitation was greatly inhibited by small amounts of ferric iron. Ferric oxalate solutions actually dissolved appreciable amounts of manganese oxalate. It was most convenient to add iron to the permanganate reagent, and a small amount of ferric nitrate was added to the permanga-

nate reagent with enough potassium acetate to prevent formation of free nitric acid from acetylation of ferric nitrate. Iron apparently coprecipitates with manganese in sufficient amounts during staining to prevent manganese oxalate formation in the demineralization step. Recovery of acid-detergent fiber ash was obtained as shown in Table 1. Possibly a small amount of iron or manganese contaminated the residue; this could be washed out with concentrated hydrobromic acid (48%) until no further red color remained.

#### METHOD

##### Reagents

(a) *Saturated potassium permanganate*.—Dissolve 50 g reagent grade  $KMnO_4$  in 1 l. water. Keep out of direct sunlight.

(b) *Buffer solution*.—Dissolve 6.0 g  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  reagent and 0.15 g  $AgNO_3$  in 100 ml distilled water. Combine with 500 ml glacial acetic acid and 5.0 g potassium acetate. Add 400 ml tertiary butyl alcohol and mix. Use grades of acid and solvent passing dichromate test.

(c) *Combined permanganate solution*.—Combine and mix 2 parts saturated potassium permanganate and 1 part buffer solution, v/v, before use. Unused mixed solution may be kept about a week in a refrigerator or a cold place in absence of light. Solution is usable if it is purple and contains no precipitate.

(d) *Demineralizing solution*.—Dissolve 50 g oxalic acid dihydrate in 700 ml 95% ethanol. Add 50 ml ca 12N HCl and 250 ml distilled water; mix.

(e) *Ethanol*.—About 80%; mix 200 ml distilled water and 800 ml 95% ethanol.

(f) *Acetone*.—Use grade that is colorless and leaves no residue upon evaporation.

##### Procedure

*Lignin*.—Dry sample at < 65°C and grind through 20-30 mesh. Prepare and determine acid-detergent fiber on 1 g sample according to standard procedure. Prepare shallow enamel pan or photographic tray with 2-3 cm cold water. Combine and mix saturated potassium permanganate and buffer solution, 2:1, v/v, and add 25 ml to crucibles. (Note: Crucibles containing fiber of a high lignin content will require more permanganate solution.) Immerse each crucible after addition in the pan in water. Adjust level of water in pan in-

Table 1. Comparison of ash and lignin analysis of acid-detergent fiber (ADF)

Sample	% Acid-Detergent Fiber			Lignin ratio
	In ADF	Ash after Treatment	72% Acid	
Alfalfa hay	0.9	1.3	27.6	23.1
Timothy hay	1.3	1.4	22.7	16.0
Cow feces (e/f/s/a)	1.5	1.5	42.0	31.9
Orchardgrass	4.2	4.4	13.5	9.7
Wheat straw	6.6	6.6	19.6	13.8
Winter fat	29.3	28.6	22.2	23.7
Rice hulls	31.1	31.1	21.3	22.9

mediately to prevent excessive flow of solution out of crucibles. Place short glass rod in each crucible to stir contents, to break lumps, and to draw permanganate solution up on sides of crucibles to wet all particles. Let crucibles stand at 20-25°C for 90±10 min, adding more mixed permanganate solution if necessary. (If crucible is full, filter solution by vacuum and add more reagent.) Mixture must be purple at all times. (Note: A brown hue without any red or purple coloration indicates that permanganate is exhausted. However, avoid addition of more solution than is necessary.) Remove crucibles to filtering apparatus and suck dry; do not wash. Place in clean enamel pan, and fill not more than half-full with demineralizing solution. After ca 5 min, suck dry on filter and refill halfway with demineralizing solution. Repeat after second interval if solution is very yellow. (Incomplete removal of lignin is indicated by a yellow color in the centers of larger fiber particles.) Rinse sides of crucibles with solution from wash bottle with fine stream. Let stand until fiber is white thoroughly wash crucible and contents with 80% ethanol. Suck dry and repeat wash twice. Wash twice in similar manner with acetone. Suck dry. Repeat staining if fiber is yellow (required only on samples of very high lignin content where lignin/acid-detergent fiber is > 35%). Dry at 100°C overnight and weigh. Calculate lignin content as loss in weight from acid-detergent fiber.

*Cellulose and ash*.—Ash at 500°C for 3 hr, cool, and weigh. Calculate cellulose as the loss in organic matter upon ashing. Calculate residue as permanganate solution through the crucible must be carefully standardized, particularly in the case of immature grasses where a single addition of permanganate solution may be sufficient. Cellulose is very rapidly digested and there is danger of loss of cellulose carbohydrates if there is too much flow.

dual ash as the difference between this weight and original tare of crucible.

(Note: Cutin material present in seed coats and other plant parts does not react and determine as lignin, and consequently does not bleach with the treatments. Cutin will appear as dark flecks in a background of white cellulose.)

#### Results and Discussion

*Lignin*.—Permanganate lignin values are higher than those obtained by the 72% sulfuric acid method. The ratio between values obtained by the two methods depends upon the material analyzed. Nevertheless, for 75 comparisons, the correlation was 0.907 and the coefficient of variation was 7.2%. The regression and scatter are shown in a proportional projection (Fig. 2). The slope of the regression of 72% acid lignin on permanganate lignin was 0.81 with an insignificant zero intercept. Regressions of cell-wall digestibility on lignin content of acid-detergent fiber were calculated for 20 test forages of known digestibility from animal trials. The constants for regression of cell-wall digestibility (Y) on log L/ADF were intercept (a) 180.8, 147.3; slope (b) -96.6, -78.9; and mean 9.9, 8.0, respectively, by permanganate and 72% acid methods (Y = a - b log L/ADF). Coefficients of variation were 1.4 and 1.0, respectively, by permanganate and acid methods; correlations were -0.96 and -0.98, respectively. Values by either analytical method are statistically convertible to digestibilities, using the appropriate regression. For the theory and use of logarithm of lignin in acid-detergent fiber and its conversion into estimates of nutritive value and digestibility, see (11).

Table 2. Comparison of lignin and cellulose values by different methods

Sample	Lignin		KMnO <sub>4</sub> Cellulose		Crampton Cellulose	
	72% Acid	KMnO <sub>4</sub>	Yield	Insol. in 72% Acid	Yield	Insol. in 72% Acid
Corn cob	4.5	6.2	35.7	0.3	35.2	0.1
Wheat straw	7.1	8.5	40.9	0.2	40.6	0.4
Red clover	9.0	12.1	34.1	0.2	36.6	0.4
Timothy	7.0	10.5	32.8	0.6	33.5	0.4
Wheat bran	3.9	4.1	9.3	0.3	10.0	0.5
Alfalfa	8.7	9.7	29.2	1.2	31.4	0.7
Feces (alfalfa)	18.9	23.1	29.4	2.1	30.7	1.5
Feces (grass)	13.3	12.3	21.6	2.4	21.7	1.7
Feces (silage)	19.5	17.9	27.3	3.2	27.4	3.0

REFERENCES

(1) Colburn, M. W., and Evans, J. L., *J. Dairy Sci.* 50, 1130-1135 (1967).

(2) Van Soest, P. J., *This Journal* 46, 829-835 (1963).

(3) Van Soest, P. J., and Jones, L. H. P., *J. Dairy Sci.* 50, 989 (1967).

(4) Edwards, P. B., and Mackney, A. W., *J. Council Sci. Ind. Res. (Australia)* 11, 185-200 (1958).

(5) Hepler, P. K., Thesis, University of Wisconsin, 1964.

(6) Browning, B. L., Chapter 23, in *Wood Chemistry*, Vol. II, 2nd Ed., L. E. Wise and E. C. Jahn (Eds.), 1962, pp. 1214-1227.

(7) Harlow, W. M., Chapter 4, in *Wood Chemistry*, Vol. I, pp. 90-131.

(8) Müllers, C., *Beitr. Wis. Botanik* 4, 160-185 (1900).

(9) Meern, M. L., in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, K. Paech and M. V. Tracey (Eds.), Vol. II, 1965, pp. 380-399.

(10) Webster, A. H., and Halpern, J., *Trans. Faraday Soc.* 53, 51-60 (1957).

(11) Van Soest, P. J., *J. Animal Sci.* 26, 119-128 (1967).

(12) Crampton, E. W., and Maynard, L. A., *J. Nutrition* 15, 383-395 (1958).

(13) Brauns, F. E., *The Chemistry of Lignin*, Chapter VIII, Academic Press, Inc., New York, 1962, pp. 285-289.

(14) Thomas, W. J., Michigan State University, East Lansing, personal communication.

(15) Lords, V., and Løschbrandt, F., *Norsk Skogind.* 10, 402-408 (1960).

chloric acid method include a shorter procedure for lignin per se while the residue is reserved for further analyses for cellulose and insoluble ash. Permanganate reagents are not corrosive and require no standardization. No filter aids are required and permanganate lignin values are not subject to some interferences that affect the 72% acid method. Important differences between the methods arise from the fate of cutin, which is largely retained in the lignin by the 72% acid method and is excluded by the permanganate method. The lignin residue from the 72% acid method has a higher carbon content than carefully prepared lignins (2, 13) and is undoubtedly degraded. The ultraviolet absorption spectra of this residue are also greatly altered, unlike spectra of forage lignins not treated with 72% sulfuric acid (14). Lords and Løschbrandt (15) have identified lignin fractions that are soluble in 72% sulfuric acid and have provided a method for their determination. There is ample evidence to support a higher true lignin figure than that which is obtained by the 72% acid method.

Permanganate lignin may yield a value closer to a true theoretical lignin value. However, it will also be affected by some factors which also affect other lignin methods. Polyphenolic and other unsaturated substances, e.g., tannins, pigments, or proteins that may not be completely removed in the acid-detergent fiber, will react with permanganate and appear as lignin. Permanganate lignin is subject to increases by heating, as is 72% acid lignin. However, preliminary observations show that the new method may be somewhat less susceptible to this artifact. Further study will be required to afford quantitative measurement in these respects.

It is recommended that these studies be continued.

This report of the Associate Referee, P. J. Van Soest, was presented at the First Annual Meeting of the Association of Official Analytical Chemists, Oct. 9-13, 1967, at Washington, D.C.

The recommendation of the Associate Referee was approved by the General Referee and by Subcommittee A, and was accepted by the Association. See *This Journal* 51, 389 (1968).

**Cellulose.**—Permanganate cellulose values are compared with those obtained by the Crampton method (12) on 18 feed samples. The Crampton method was chosen over other methods because of its wide-spread use and convenience. Values by the two methods were very similar; the correlation was 0.992 and the coefficient of variation was 3.6% (Fig. 3). Permanganate cellulose values averaged 96% of Crampton cellulose. Certain materials yielded lower values by the permanganate method (Table 2). Both celluloses contained a small sulfuric acid-insoluble fraction that was probably cutin.

**Conclusions and Recommendation**

The advantages of the permanganate method for lignin over the 72% hydro-

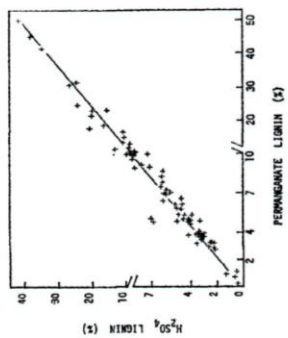


Fig. 2.—Relation of permanganate lignin with 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lignin for 76 samples. Regression equation:  $Y = 0.81X - 0.1$ , correlation 0.997.

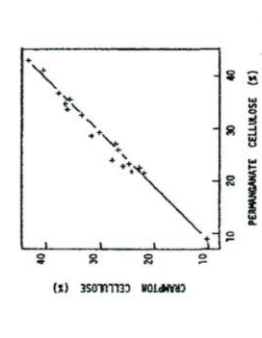


Fig. 3.—Relation of permanganate cellulose and Crampton cellulose for 18 samples. Regression equation:  $Y = 0.95X + 1.3$ , correlation 0.992.





## Standard Test Methods for Sodium Carboxymethylcellulose<sup>1</sup>

This standard is issued under the fixed designation D 1439; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon ( $\epsilon$ ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

### 1. Scope

1.1 These test methods cover the testing of sodium carboxymethylcellulose.

1.2 The test procedures appear in the following order:

	Sections
Moisture	4-9
Degree of Etherification:	
Test Method A—Acid Wash	10-17
Test Method B—Nonaqueous Titration	10, 11, 18-23
Viscosity	24-30
Purity	31-38
Sodium Glycolate	39-47
Sodium Chloride	48-55
Density	56-62

1.3 The values stated in SI units are to be regarded as the standard. The values given in parentheses are for information only.

1.4 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.* For specific hazard statements, see 15.1 and 20.

### 2. Referenced Documents

- 2.1 *ASTM Standards*:<sup>2</sup>  
D 1347 Test Methods for Methylcellulose  
E 1 Specification for ASTM Thermometers

### 3. Purity of Reagents

3.1 Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall

conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society<sup>3</sup>, where such specifications are available. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

3.2 Unless otherwise indicated, references to water shall be understood to mean distilled water.

## MOISTURE

### 4. Scope

4.1 This test method covers the determination of the volatile content of sodium carboxymethylcellulose.

4.2 The results of this test are used for calculating the total solids in the sample; and, by common usage, all materials volatile at this test temperature are designated as moisture.

### 5. Significance and Use

5.1 Moisture analysis (along with purity) is used to calculate the amount of active polymer in the material and must be considered when determining the amount of sodium carboxymethylcellulose to use in various formulations.

### 6. Apparatus

6.1 *Oven*—Gravity convection oven, capable of maintaining a temperature of  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ .

6.2 *Weighing Bottles*, low-form, 50-mm inside diameter by 30-mm height, or equivalent.

6.3 *Analytical Balance*.

### 7. Procedure

7.1 Weigh 3 to 5 g of the sample to the nearest 0.001 g in a tared and covered weighing bottle.

7.2 Place the bottle in an oven at  $105^\circ\text{C}$  for 2 h with the cover removed. Cool the bottle in a desiccator, replace the cover, and weigh.

7.3 Replace the sample in the oven for 30 min, cool, and reweigh.

<sup>1</sup> These test methods are under the jurisdiction of ASTM Committee D01 on Paint and Related Coatings, Materials, and Applications and are the direct responsibility of Subcommittee D01.36 on Cellulose and Cellulose Derivatives.

Current edition approved Dec. 1, 2003. Published January 2004. Originally approved in 1956. Last previous edition approved in 1997 as D 1439 – 97.

<sup>2</sup> For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, [www.astm.org](http://www.astm.org), or contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org). For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

<sup>3</sup> *Reagent Chemicals, American Chemical Society Specifications*, American Chemical Society, Washington, DC. For suggestions on the testing of reagents not listed by the American Chemical Society, see *Analar Standards for Laboratory Chemicals*, BDH Ltd., Poole, Dorset, U.K., and the *United States Pharmacopeia and National Formulary*, U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. (USPC), Rockville, MD.

7.4 Continue this procedure to a mass loss of not more than 5 mg for 30 min drying time.

## 8. Calculation

8.1 Calculate the percent moisture,  $M$ , as follows:

$$M = (A/B) \times 100 \quad (1)$$

where:

$A$  = mass loss on heating, g, and

$B$  = sample used, g.

## 9. Precision and Bias

9.1 *Precision*—Statistical analysis of interlaboratory reproducibility test results on samples containing 2 to 10 % moisture indicates a precision of  $\pm 0.2$  % absolute at the 95 % confidence level.

9.2 *Bias*—No justifiable statement can be made on the bias of the procedure for measuring moisture because no suitable reference material exists.

## DEGREE OF ETHERIFICATION

### 10. Scope

10.1 These test methods cover the determination of the degree of etherification (D.E.) of sodium carboxymethylcellulose.

10.2 Two test methods are included as follows:

10.2.1 *Test Method A (Acid Wash)*, for crude grades of sodium carboxymethylcellulose with degrees of etherification up to 0.85. Above 0.85 degree of etherification, slightly low results may be obtained.

10.2.2 *Test Method B (Nonaqueous Titration)*, for purified grades of sodium carboxymethylcellulose of all degrees of etherification. It is not applicable to the crude grades.

*Test Method A—Acid Wash*

### 11. Summary of Test Method

11.1 The water-soluble sodium carboxymethylcellulose is converted to the insoluble acid form, purified by washing, dried, and then a weighed sample is reconverted to the sodium salt with a measured excess of sodium hydroxide.

### 12. Significance and Use

12.1 These test methods determine the amount of substituent groups added to the cellulose backbone. The level can greatly affect solution properties, rheology, viscosity, hygroscopicity, salt tolerance, and many other properties of the polymer.

### 13. Apparatus

13.1 *Stirrer*, air-driven.

13.2 *Buchner Funnel*, 75-mm, fitted with a 70-mm fine-texture, heavy-duty filter paper. A 60-mm medium-porosity, fritted glass funnel may also be used.

13.3 *Drying Oven*, maintained at 105°C.

### 14. Reagents

14.1 *Diphenylamine Reagent*—Dissolve 0.5 g of diphenylamine in 120 mL of sulfuric acid ( $H_2SO_4$ , 9 + 2). The reagent

should be essentially water-white. It will give a deep blue coloration with traces of nitrate or other oxidizing agents.

14.2 *Ethyl Alcohol* (95 volume %)—Denatured ethyl alcohol conforming to either Formula 2B, 3A, or 30 of the U. S. Bureau of Internal Revenue.

14.3 *Ethyl Alcohol* (80 % by volume)—Dilute 840 mL of Formula 2B, 3A, or 30 denatured alcohol to 1 L with water.

14.4 *Hydrochloric Acid, Standard* (HCl, 0.3 to 0.5  $N$ ).

14.5 *Methanol*, anhydrous.

14.6 *Nitric Acid* (sp gr 1.42)—Concentrated nitric acid ( $HNO_3$ ).

14.7 *Sodium Hydroxide, Standard Solution* (0.3 to 0.5  $N$ )—Prepare and standardize a 0.3 to 0.5  $N$  solution of sodium hydroxide (NaOH).

14.8 *Sulfuric Acid* (9 + 2)—Carefully mix 9 volumes  $H_2SO_4$  with 2 volumes of water.

## 15. Procedure

15.1 Weigh approximately 4 g of the sample into a 250-mL beaker and add 75 mL of ethyl alcohol (95 %). Stir the mixture with an air-driven stirrer until a good slurry is obtained. Add 5 mL of  $HNO_3$ , while agitating, and continue agitation for 1 to 2 min. Heat the slurry and boil for 5 min. (**Warning**—Exercise care to avoid fire.) Remove the heat and continue agitation for 10 to 15 min.

15.2 Decant the supernatant liquid through the filter and transfer the precipitate to the filter with 50 to 100 mL of ethyl alcohol (95 %). Wash the precipitate with ethyl alcohol (80 %) that has been heated to 60°C, until all of the acid has been removed.

15.3 Test for the removal of acid and salts (ash) by mixing a drop of the acid carboxymethylcellulose slurry from the filter with a drop of diphenylamine reagent on a white spot plate. A blue color indicates the presence of nitrate and the necessity for further washing. If the first drop of reagent does not produce a blue color, further drops should be added until an excess of reagent is known to be present, noting the color after each drop. Four to six washings will usually suffice to give a negative test for nitrate.

15.4 Finally, wash the precipitate with a small amount of anhydrous methanol and draw air through it until the alcohol is completely removed. Transfer the precipitate to a glass or aluminum weighing dish provided with a cover. Heat the uncovered dish on a steam bath until the odor of alcohol can no longer be detected (in order to avoid fires due to methanol fumes in the oven), then dry the dish and contents, uncovered for 3 h at 105°C. Place the cover on the dish and cool to room temperature in a desiccator.

15.5 The sulfate ash content of the sample at this point should be less than 0.5 % when determined on 0.5 g of the sample by the procedure given in the Ash as Sulfate section of Test Methods D 1347. If the ash content is greater than 0.5 %, rewash the sample with ethyl alcohol (80 %). If necessary, repeat the procedure described in 13.1-13.3 to 13.4.

15.6 Weigh, to the nearest 0.01 g, about 1 to 1.5 g of the dried acid carboxymethylcellulose (depending on the normality of the acid and base to be used) into a 500-mL Erlenmeyer flask. Add 100 mL of water and 25.00 mL of 0.3 to 0.5  $N$



NaOH solution, while stirring. Heat the solution to boiling, and boil for 15 to 30 min.

15.7 Titrate the excess NaOH, while the solution is hot, with the 0.3 to 0.5 *N* HCl to a phenolphthalein end point.

### 16. Calculation

16.1 Calculate the degree of etherification, *G*, as follows:

$$A = (BC - DE)/F \quad (2)$$

$$G = 0.162A/(1 - 0.0584A) \quad (3)$$

where:

- A* = milliequivalents of acid consumed per gram of sample,
- B* = NaOH solution added, mL,
- C* = normality of the NaOH solution,
- D* = HCl required for titration of the excess NaOH, mL,
- E* = normality of the HCl,
- F* = acid carboxymethylcellulose used, g,
- 162 = gram molecular mass of the anhydroglucose unit of cellulose, and
- 58 = net increase in molecular mass of anhydroglucose unit for each carboxymethyl group substituted.

### 17. Precision and Bias

17.1 *Precision*—Statistical analysis of intralaboratory (repeatability) test results indicates a precision of  $\pm 0.04$  D.E. units at the 95 % confidence level.

17.2 *Bias*—No justifiable statement can be made on the bias of the procedure for measuring degree of etherification because no suitable reference material exists.

*Test Method B—Nonaqueous Titration*

### 18. Summary of Test Methods

18.1 This measurement is based upon a nonaqueous acid-base titration. The sample is refluxed with glacial acetic acid, and the resulting sodium acetate is titrated with a standard solution of perchloric acid in dioxane, to a potentiometric end point. Impurities containing alkaline sodium will also be titrated under these conditions. Sodium chloride does not interfere.

### 19. Apparatus

19.1 *pH Meter*, equipped with a standard glass electrode and a calomel electrode modified as follows:

19.1.1 Discard the aqueous potassium chloride solution, then rinse and fill with the calomel electrode solution as described in 20.2.

19.1.2 Add a few crystals of potassium chloride and silver chloride or silver oxide to the electrode.

19.2 *Buret*, micro, 10-mL capacity.

### 20. Reagents

20.1 *Acetic Acid*, glacial.

20.2 *Calomel Electrode Solution*—Add 2 g of potassium chloride (KCl) and 2 g of silver chloride (AgCl) or silver oxide (Ag<sub>2</sub>O) to 100 mL of methanol and shake thoroughly to saturate. Use the supernatant liquid.

20.3 *1,4-Dioxane*.

20.4 *Perchloric Acid* (0.1 *N*)—Add 9 mL of concentrated perchloric acid (HClO<sub>4</sub>, 70 % to 1 L of dioxane, with stirring (**Warning**—The solution of perchloric acid in dioxane should never be heated or allowed to evaporate.). Store in an amber glass bottle. Any slight discoloration that appears on standing may be disregarded.

20.4.1 Standardize the solution as follows: Dry potassium acid phthalate for 2 h at 120°C. Weigh 2.5 g to the nearest 0.0001 g into a 250-mL volumetric flask. Add glacial acetic acid, shake to dissolve, and then make up to volume and mix thoroughly. Pipet 10 mL into a 100-mL beaker and add 50 mL of acetic acid. Place on a magnetic stirrer and insert the electrodes of the pH meter. Add nearly the required amount of HClO<sub>4</sub> from a buret, then decrease the increments to 0.05 mL as the end point is approached. Record the millilitres of titrant versus millivolts, and continue the titration a few millilitres beyond the end point. Plot the titration curve and read the volume of titrant at the inflection point. Calculate the normality, *N*, as follows:

$$N = (A \times 10 \times 1000)/(B \times 204.22 \times 250) \quad (4)$$

where:

- A* = potassium acid phthalate used, g,
- B* = HClO<sub>4</sub> added, mL,
- 204.22 = gram molecular mass of potassium acid phthalate,
- 10 = potassium acid phthalate solution added, mL, and
- 250 = glacial acetic acid used to dissolve potassium acid phthalate, mL.

20.5 *Potassium Acid Phthalate*, primary standard, National Institute of Standards and Technology Standard Sample No. 84.

### 21. Procedure

21.1 Weigh 0.2 g of the sample, to the nearest 0.0001 g, into a 250-mL Erlenmeyer flask with ground-glass joint. Add 75 mL of acetic acid, connect to a water-cooled condenser, and reflux gently on a hot plate for 2 h.

21.2 Cool, and transfer the solution to a 250-mL beaker with the aid of 50 mL of acetic acid. Place on the magnetic stirrer and titrate to a potentiometric end point with 0.1 *N* HClO<sub>4</sub> in accordance with 20.4.

### 22. Calculation

22.1 Calculate the degree of etherification, *H*, as follows (Note 1):

$$M = (AN \times 100)/(G \times (100 - B)) \quad (5)$$

$$H = 0.162 M/(1.000 - (0.080 M)) \quad (6)$$

where:

- M* = milliequivalents of acid consumed per gram of sample,
- A* = HClO<sub>4</sub> added, mL,
- N* = normality of HClO<sub>4</sub>,
- G* = sample used, g,
- B* = percent moisture, determined on a separate sample, in accordance with Sections 4-7,



- 162 = gram molecular mass of an anhydroglucose unit of cellulose, and
- 80 = net increase in molecular mass of an anhydroglucose unit for each sodium carboxymethyl group added.

NOTE 1—The result calculated in accordance with Section 18 includes the alkaline sodium from sodium glycolate; however, if the latter is less than 0.5 %, the interference is negligible.

**23. Precision and Bias**

23.1 *Precision*—Statistical analysis of interlaboratory test results indicates the precision of this test method as shown below:

Approximate D.E. Level	Precision, D.E. Units (95 % Confidence Level)
0.40	±0.010
0.80	±0.012
1.35	±0.038

23.2 *Bias*—No justifiable statement can be made on the bias of the procedure for measuring degree of etherification because no suitable reference material exists.

**VISCOSITY**

**24. Scope**

24.1 This is an arbitrary test method for determining the viscosity of aqueous solutions of sodium carboxymethylcellulose in the viscosity range from 10 to 10 000 cP at 25°C.

24.2 The concentration to be used for the test should be agreed upon between the purchaser and the seller. It should be such that the viscosity of the solution will fall within the range of this test.

24.3 The results for the viscosity of sodium carboxymethylcellulose by this test method will not necessarily check with results from other types of instruments used for viscosity measurements.

24.4 The determinations are run on a calculated dry basis; that is, the amount of sodium carboxymethylcellulose required for the desired concentration on a dry basis is calculated from the known moisture content.

24.5 This test method is intended for referee purposes. The Brookfield spindles and speeds given in Table 1 are recommended for this purpose, but slight derivations from the table may occasionally be found convenient for individual application.

**25. Significance and Use**

25.1 This test method determines the relative ability of the polymer to thicken water. This is the primary function of sodium carboxymethylcellulose.

TABLE 1 Viscometer Spindles Required for Given Speeds

Viscosity Range, cP	Spindle No.	Speed, rpm	Scale	Factor
10 to 100	1	60	100	1
100 to 200	1	30	100	2
200 to 1000	2	30	100	10
1000 to 4000	3	30	100	40
4000 to 10000	4	30	100	200

**26. Apparatus**

26.1 *Viscometer*, Brookfield type.

26.2 *Container*—Glass jar, approximately 64-mm (2½-in.) in diameter and 152 mm (6 in.) deep, unconstricted at the top, capacity 340 g (12 oz).

26.3 *Analytical Balance*.

26.4 *Mechanical Stirrer*—Stirrer constructed of stainless steel (Fig. 1) attached to a variable speed motor capable of operating at 900 ± 100 rpm under varying load conditions.

26.5 *Water Bath*, constant-temperature, set at 25°C and capable of maintaining that temperature within ±0.2°C.

26.6 *Thermometer*—ASTM Saybolt Viscosity Thermometer having a range from 19 to 27°C and conforming to the requirements for Thermometer 17C, as prescribed in Specification E 1.

**27. Procedure**

27.1 Determine moisture in accordance with Sections 4-9.

27.2 Calculate the dry-basis sample mass, *M*, in grams necessary to make 240 g of test solution as follows:

$$M = 100A / (100 - B) \tag{7}$$

where:

*A* = desired dry mass of sample, g, and

*B* = moisture in the sample as received, %.

27.3 Calculate the quantity of distilled water required as follows:

$$V = 240 - S \tag{8}$$

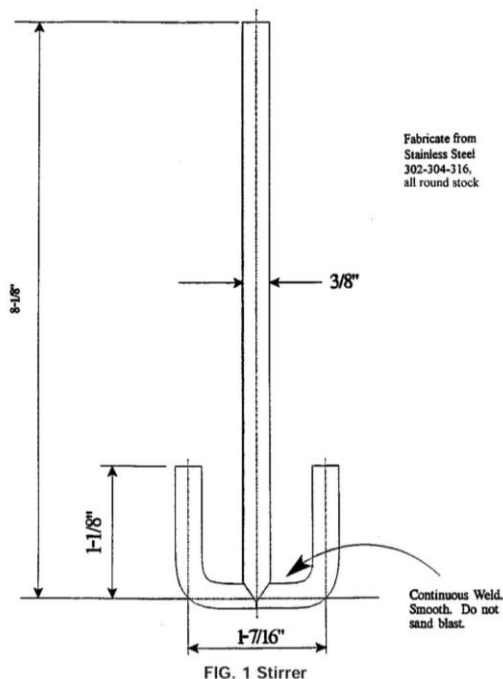


FIG. 1 Stirrer

where:

$V$  = volume of distilled water, mL, and

$S$  = mass of sample, g.

27.4 Add the calculated quantity of water to the jar. Position the stirrer in the jar allowing minimum clearance between the stirrer and the bottom of the container.

27.5 Begin stirring and slowly add the sodium carboxymethylcellulose specimen. Adjust the stirring speed to approximately  $900 \pm 100$  r/min and mix for exactly 2 h. Do not allow the stirring speed to exceed 1200 r/min since higher speeds tend to affect viscosity on certain grades of sodium carboxymethylcellulose.

NOTE 2—If the specimen is added too rapidly, agglomeration will occur. This may prevent complete dissolution within the required mixing time.

27.6 Remove the stirrer and transfer the specimen container to the constant-temperature bath for 1 h. Check the specimen temperature with a thermometer at the end of 1 h to ensure that the test temperature has been reached.

27.7 Remove the specimen container from the bath and shake vigorously for 10 s. Measure the viscosity with the Brookfield viscometer, selecting the proper spindle and speed from Table 1. Allow the spindle to rotate for three min before taking the reading.

## 28. Calculation

28.1 Calculate the viscosity,  $V$ , in centipoises as follows:

$$V = \text{reading} \times \text{factor} \quad (9)$$

## 29. Report

29.1 Report the results as Brookfield viscosity at 25 C, stating the solution concentration and the spindle and speed used.

## 30. Precision and Bias

30.1 *Precision*—Statistical analysis of interlaboratory (reproducibility) test results indicates a precision of  $\pm 10$  % at the 95 % confidence level.

30.2 *Bias*—No justifiable statement can be made on the bias of the procedure for measuring viscosity because no suitable reference material exists.

## PURITY OF CRUDE SODIUM CARBOXYMETHYLCELLULOSE

### 31. Scope

31.1 This test method covers the determination of purity or percent of active ingredient in crude sodium carboxymethylcellulose containing no phosphate. The test method has been standardized on materials having a degree of etherification of about 0.85 or less.

31.2 For determination of purity of refined sodium carboxymethylcellulose (purity approximately 98 % or higher), analysis for individual or combined impurities and calculation of purity by difference will give more reliable results.

### 32. Summary of Test Method

32.1 A 3-g sample is stirred mechanically in a beaker for 15 min with each of two 150-mL portions of ethanol (80 % by

volume) at a temperature of 60 to 65°C. The supernatant liquid is decanted through a tared filtering crucible after each treatment. The undissolved matter is transferred quantitatively to the crucible, dried, weighed, and calculated as percent of sodium carboxymethylcellulose. The temperature of the ethanol during the leaching need not be closely controlled, but the concentration of the ethanol must be closely controlled (sp gr within 0.001).

### 33. Significance and Use

33.1 This test method is intended for use in testing sodium carboxymethylcellulose for applications in which purity is not a critical property. If purity greater than 98 % is required, analysis for individual impurities (sodium chloride and sodium glycolate) is essential.

### 34. Apparatus

34.1 *Filtering Crucible*, fritted glass, medium-porosity, 50-mL capacity.

34.2 *Mechanical Stirring Motor*, electric or air-driven, with any convenient stirrer of appropriate size.

34.3 *Water Bath*, constant-temperature, maintained at 60 to 65°C.

34.4 *Cover*—A lid to keep a 400-mL beaker substantially covered during mechanical stirring in bath. A flanged lid, preferably of stainless steel, with a slot, wide enough to pass the shaft of the mechanical stirrer, cut from the rim to the center, has been found satisfactory. The center should be cut out somewhat larger than the shaft of the stirrer to permit free rotation of the stirrer. Such a lid serves to weight down the beaker as well as to minimize the evaporation losses during leaching.

### 35. Reagents

35.1 *Ethanol* (95 volume %)—Undenatured or specially denatured ethanol conforming to Formula 2B (Note 3) of the U. S. Bureau of Internal Revenue.

NOTE 3—Other grades of denatured alcohol, such as Formula 3A, are not satisfactory for this purpose.

35.2 *Ethanol* (80 volume %)—Dilute 840 mL of 95 % ethanol (30.1) to 1 L with water. The specific gravity should be  $0.857 \pm 0.001$  at 25/25°C. If necessary, add water or ethanol until the specific gravity is within the specified limits.

35.3 *Ethyl Ether*, anhydrous, ethanol-free.

### 36. Procedure

36.1 Weigh 3 to 5 g of the sample into a tared low-form, 65-mm diameter glass weighing dish fitted with a cover. Dry to constant mass at  $105 \pm 1^\circ\text{C}$  in either a gravity or a mechanical convection oven. Weigh at the end of an initial 2-h heating period, then continue with 30-min heating periods until the change in mass during a 30-min heating period is not more than 0.10 %. If there is an increase in mass of the sample during one or more drying periods, record the lowest mass observed as the mass for use in the calculation of moisture content. Calculate the loss in mass as the percent of moisture in the sample.

36.2 Weigh  $3 \pm 0.1$  g of the sample, in the "as-received" condition, to the nearest 0.001 g and transfer to a 400-mL beaker.



36.3 Add 150 mL of ethanol (80 %) that has been heated to between 60 and 65°C, and immediately place the beaker in a constant-temperature water bath maintained at 60 to 65°C. The level of the water in the bath should be somewhat higher than the level of the liquid in the beaker. Cover the beaker as completely as possible with a lid that will permit mechanical stirring. Lower a mechanical stirrer almost to the bottom of the beaker, and stir for 10 min at a rate suitable to provide good agitation without spattering material on the walls of the beaker above the liquid level.

36.4 Stop the stirrer. Allow the undissolved matter to settle with the beaker still in the bath, and then decant the hot supernatant liquid as completely as possible through a tared, fritted-glass filtering crucible.

36.5 Add 150 mL of ethanol (80 %), at 60 to 65°C to the beaker and proceed in accordance with 32.3 and 32.4.

36.6 After decanting the supernatant liquid as completely as possible, transfer the insoluble matter to the crucible with the aid of ethanol (80 %) at 60 to 65°C in a wash bottle, being careful to scrape all insoluble matter from the lid, the stirrer, and the beaker. A total of about 250 mL of ethanol (80 %) will normally be required to transfer the insoluble matter to the crucible and to further wash the insoluble matter in the crucible. During the operations prescribed in this paragraph, apply suction only while filtration is in progress. Make every effort to avoid drying-out of the filter cake. If fines appear to pass through the filter, use only gentle suction.

36.7 Wash the residue in the crucible with 50 mL of ethanol (95 %) at room temperature, and finally with several portions of ether at room temperature (Note 4). Without permitting suction to continue longer than necessary, place the crucible in a beaker or weighing bottle on the steam bath until no odor of ether can be detected.

NOTE 4—Thorough washing with ether is necessary to remove ethanol completely from the insoluble matter. If ethanol is not completely removed before oven drying, it may not be completely removed during the oven drying.

36.8 Place the crucible in an oven at  $105 \pm 1^\circ\text{C}$  for 1 h. Stir the contents of the crucible with a dissecting needle or thin rod (preferably of smooth-surfaced metal) to break up the cake and facilitate complete drying. Again, dry at  $105 \pm 1^\circ\text{C}$  for 1 h. Place the crucible in a desiccator. Cover it with a flat glass plate, weighing bottle cover, or other suitable cover to minimize absorption of moisture from the atmosphere in the desiccator; and cool to room temperature (at least 30 min). Weigh the uncovered crucible as rapidly as possible.

36.9 Dry the crucible for additional 1-h periods until the change in mass during a 1-h drying period does not exceed 0.003 g. If increases in mass are observed after such additional drying periods, record the lowest mass observed as the mass of the crucible plus dry sodium carboxymethylcellulose.

### 37. Calculation

37.1 Calculate the percent sodium carboxymethylcellulose, *S*, on the dry basis as follows:

$$S = (A \times 10\,000)/(B(100 - C)) \quad (10)$$

where:

*A* = mass of dried residue, g,  
*B* = mass of specimen used, g, and  
*C* = moisture in the specimen as received, %.

### 38. Precision and Bias

38.1 *Precision*—Statistical analysis of interlaboratory (reproducibility) test results indicate a precision of  $\pm 0.6\%$  absolute at the 95 % confidence level.

38.2 *Bias*—No justifiable statement can be made on the bias of the procedure for measuring purity of crude sodium carboxymethylcellulose because no suitable reference material exists.

## SODIUM GLYCOLATE

### 39. Scope

39.1 This test method covers the determination of the sodium glycolate content of purified sodium carboxymethylcellulose containing not more than 2.0 % sodium glycolate.

### 40. Summary of Test Method

40.1 The sodium carboxymethylcellulose is dissolved in acetic acid (50 %), precipitated with acetone and sodium chloride and the insoluble material filtered off. The filtrate containing the sodium glycolate (as glycolic acid) is treated to remove the acetone and reacted with 2,7-dihydroxy naphthalene. The resulting color is measured at 540 nm with a spectrophotometer calibrated with known solutions.

### 41. Significance and Use

41.1 This test method (along with moisture and sodium chloride) is used to calculate the amount of active polymer in the material. It must be used when analyzing highly purified (>98 %) grades of sodium carboxymethylcellulose, especially in government-regulated applications (that is, food, pharmaceuticals, cosmetics, etc.).

### 42. Apparatus

42.1 *Spectrophotometer or Filter Photometer*, suitable for measuring absorbance at 540 nm.

42.2 *Absorption Cells*, for spectrophotometer, 1-cm light path.

42.3 *Aluminum Foil*—Cut to approximately 2-in. (51-mm) squares.

### 43. Reagents

43.1 *Acetic Acid*, glacial.

43.2 *Acetone*.

43.3 *Dihydroxy Naphthalene Reagent* (0.100 g/L)—Dissolve 0.100 g of 2,7-dihydroxy naphthalene in 1 L of sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Before using, allow the solution to stand until the initial yellow color disappears. If the solution is very dark, discard it and prepare a new solution from a different supply of  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . This solution is stable for approximately 1 month if stored in a dark bottle.

43.4 *Glycolic Acid, Standard Solution* (1 mg glycolic acid/mL)—Dry several grams of glycolic acid in a desiccator at room temperature overnight. Accurately weigh 0.100 g of the dried material, dissolve in water, and make up to volume in a

100-mL volumetric flask. This solution will contain 1 mg of glycolic acid/mL. The solution is stable for approximately 1 month.

43.5 *Sodium Chloride* (NaCl).

43.6 *Sulfuric Acid* (sp gr 1.84)—Concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### 44. Preparation of Calibration Curve

44.1 Into a series of five 100-mL volumetric flasks accurately introduce 1, 2, 3, and 4-mL aliquots of the standard glycolic acid solution, reserving the fifth flask for a blank. Add sufficient water to each flask to give a total volume of 5 mL. Add 5 mL of glacial acetic acid, make up to volume with acetone and mix. These solutions will contain 0, 1, 2, 3 and 4 mg of glycolic acid, respectively.

44.2 Pipet 2 mL of each of these solutions into individual 25-mL volumetric flasks. Place the uncovered flasks upright in a boiling water bath for exactly 20 min to remove the acetone. Remove the flasks from the bath and cool.

44.3 To each flask add 20 mL of 2,7-dihydroxy naphthalene reagent as follows: Add 5 mL of reagent initially, mix thoroughly, then add the remaining 15 mL of reagent and mix. Cover the mouth of the flasks with a small piece of aluminum foil and place upright in the boiling water bath for 20 min. Remove from the bath, cool, and make up to volume with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

44.4 Measure the absorbance of each solution at 540 nm against the blank solution. Plot the milligrams of glycolic acid in the original 100 mL of solution against absorbance to give a calibration curve.

#### 45. Procedure

45.1 Weigh about 0.5 g of the sample (0.2 g for semirefined grades) to the nearest 0.001 g and transfer to a 100-mL beaker. Moisten the specimen thoroughly with 5 mL of acetic acid followed by 5 mL of water, and stir with a glass rod until solution is complete (usually about 15 min is required). Slowly add 50 mL of acetone, stirring during addition, followed by approximately 1 g of NaCl. Stir several minutes to ensure complete precipitation of the carboxymethylcellulose.

45.2 Filter through a soft, open-texture paper, previously wetted with a small amount of acetone, and collect the filtrate in a 100-mL volumetric flask. Use an additional 30 mL of acetone to facilitate transfer of the solids and to wash the filter cake. Make up to volume with acetone and mix.

45.3 Prepare a blank solution containing 5 mL of water and 5 mL of glacial acetic acid in another 100-mL volumetric flask. Make up to the mark with acetone and mix.

45.4 Pipet 2 mL of the solution from the specimen and 2 mL of the blank solution into separate 25-mL volumetric flasks. Develop the color and measure the absorbance in accordance with 44.2 to 44.4.

45.5 Using the observed absorbance, refer to the calibration curve and read the corresponding milligrams of glycolic acid.

#### 46. Calculation

46.1 Calculate the percent sodium glycolate content, *C*, as follows:

$$C = (B \times 12.9) / [W \times (100 - A)] \quad (11)$$

where:

*B* = glycolic acid, read from the calibration curve, mg,  
*W* = sample used, g,  
*A* = moisture in the sample as received, %, and  
 12.9 = (gram molecular mass of sodium glycolate per gram molecular mass of glycolic acid) × 10.

#### 47. Precision and Bias

47.1 *Precision*—Statistical analysis of intralaboratory (repeatability) data on material containing less than 0.50 % sodium glycolate indicate a precision of ±0.03 % absolute at the 95 % confidence level.

47.2 *Bias*—No justifiable statement can be made on the bias of the procedure for measuring sodium glycolate because no suitable reference material exists.

### SODIUM CHLORIDE

#### 48. Scope

48.1 This test method covers the determination of the sodium chloride content of purified sodium carboxymethylcellulose.

#### 49. Summary of Test Method

49.1 The sodium carboxymethylcellulose is dissolved in water and titrated with a standard solution of silver nitrate to a potentiometric end point. Hydrogen peroxide is added to reduce the viscosity of the solution.

#### 50. Significance and Use

50.1 This test method (along with moisture and sodium glycolate) is used to calculate the amount of active polymer in the material. It must be used when analyzing highly purified (>98 %) grades of sodium carboxymethylcellulose, especially in government-regulated applications (that is, food, pharmaceuticals, cosmetics, etc.).

#### 51. Apparatus

51.1 *pH Meter*, equipped with a silver electrode and a mercurous sulfate-potassium sulfate electrode.

51.2 *Buret*, micro, 10-mL capacity.

#### 52. Reagents

52.1 *Hydrogen Peroxide* (30 mass %)—Concentrated hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

52.2 *Nitric Acid* (sp gr 1.42)—Concentrated nitric acid (HNO<sub>3</sub>).

52.3 *Silver Nitrate, Standard Solution* (0.1 *N*)—Dissolve 17.0 g of silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) in 1 L of water. Store in an amber glass bottle. Standardize the solution as follows:

52.3.1 Dry the sodium chloride (NaCl) for 2 h at 120°C. Weigh 0.65 g to the nearest 0.0001 g, into a 250-mL beaker and add 100 mL of water. Place on a magnetic stirrer, add 10 mL of HNO<sub>3</sub>, and insert the electrodes of the pH meter. Add nearly the required amount of AgNO<sub>3</sub> solution from a buret, then decrease the increments to 0.05 mL as the end point is approached. Record the millilitres of titrant versus millivolts, and continue the titration a few millilitres beyond the end



point. Plot the titration curve and read the volume of titrant at the inflection point. Calculate the normality,  $N$ , as follows:

$$N = (A \times 1000)/(B \times 58.45) \quad (12)$$

where:

- $A$  = NaCl used, g,
- $B$  = AgNO<sub>3</sub> solution added, mL, and
- 58.45 = gram molecular mass of NaCl.

52.4 *Sodium Chloride* (NaCl).

### 53. Procedure

53.1 Weigh 5 g of the sample, to the nearest 0.0001 g, into a 250-mL beaker. Add 50 mL of water and 5 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %). Place the beaker on a steam bath, stirring occasionally to achieve a nonviscous solution. If solution is not complete after 20 min, add 5 mL more of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and heat until solution is complete.

53.2 Cool the beaker, add 100 mL of water and 10 mL of HNO<sub>3</sub>. Place it on the magnetic stirrer and titrate to a potentiometric end point with 0.1  $N$  AgNO<sub>3</sub> solution in 46.3.

### 54. Calculation

54.1 Calculate the percent sodium chloride content,  $C$ , as follows:

$$C = (AN \times 584.5)/(G \times (100 - B)) \quad (13)$$

where:

- $A$  = AgNO<sub>3</sub> solution added, mL,
- $N$  = normality of AgNO<sub>3</sub> solution,
- $G$  = sample used, g,
- $B$  = moisture, determined on a separate sample, %, in accordance with Sections 4-7, and
- 584.5 = gram molecular mass of NaCl  $\times$  10.

### 55. Precision and Bias

55.1 *Precision*—The precision of this test method is estimated to be  $\pm 0.05$  % absolute for material containing less than 0.50 % sodium chloride and  $\pm 0.10$  % absolute for material containing greater than 0.59 % sodium chloride.

55.2 *Bias*—No justifiable statement can be made on the bias of the procedure for measuring sodium chloride because no suitable reference material exists.

## DENSITY

### 56. Scope

56.1 This test method covers the determination of the bulk density of sodium carboxymethylcellulose.

### 57. Summary of Test Method

57.1 A weighed amount of sodium carboxymethylcellulose is transferred to a 100-mL graduated cylinder and the graduate vibrated to settle the powder.

### 58. Significance and Use

58.1 The density of the material can relate to dry flow properties, rate of dissolution, lumping, and package and storage space requirements.

### 59. Apparatus

59.1 *Vibrator*—A magnetic-type electric vibrator attached to the vertical support rod of a ring stand approximately 1 ft (0.3 m) above the base. A condenser clamp of sufficient size to hold a 100-mL graduated cylinder also shall be attached to the above rod. The base of the stand should be weighted.

### 60. Procedure

60.1 Place 50.0 g of sodium carboxymethylcellulose in a 100-mL graduated cylinder and place it in the condenser clamp. Turn on the vibrator and allow the cylinder to vibrate for 3 min. Record the level (in millilitres) to which the specimen has compacted.

60.2 Alternatively, the specimen may be compacted manually. Tap it on a hard surface by dropping the cylinder repeatedly from a height of about 1 in. (25 mm) until the volume of the specimen remains constant. In order to prevent cylinder breakage, cover the tapping surface with a 1/8 to 1/4-in. (3 to 6-mm) thick rubber sheet or use a plastic graduated cylinder.

### 61. Calculation

61.1 Calculate the density,  $D$ , in grams per millilitre as follows:

$$D = 50/r \quad (14)$$

where:

- $r$  = observed reading, mL.

### 62. Precision and Bias

62.1 *Precision*—Statistical analysis of intralaboratory (repeatability) test results indicates a precision of  $\pm 0.04$  g/mL at the 95 % confidence level.

62.2 *Bias*—No justifiable statement can be made on the bias of the procedure for measuring density because no suitable reference material exists.

### 63. Keywords

63.1 degree of etherification; density; moisture; purity; sodium carboxymethylcellulose; sodium chloride; sodium glycolate; viscosity

*ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.*

*This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of this standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.*